

*Journal of Chromatography*, 376 (1986) 199–210

*Biomedical Applications*

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 2945

## IMMOBILISATION D'INHIBITEURS ENZYMATIQUES POUR LA RÉALISATION DE CAPTEURS IMMUNOLOGIQUES RÉVERSIBLES

J.L. BOITIEUX\*

*Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne,  
B.P. 233, 60206 Compiègne Cedex (France)*

G. DESMET

*Laboratoire d'Hormonologie, C.H.U. Amiens, 80030 Amiens Cedex (France)*

et

D. THOMAS

*Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne,  
B.P. 233, 60206 Compiègne Cedex (France)*

---

### SUMMARY

#### *Immobilization of enzymatic inhibitors for the realization of reversible immuno-sensors*

The authors propose the use of specific sensors immobilized by ligands onto artificial supports, and the elaboration of a computerized system for the determination of various antigens, haptens or antibodies in biological fluids according to enzyme-linked immunosorbent assay techniques. Two enzymes are applied in this technique: the first (ribonuclease) for reversibly linking the immunocomplex to the insoluble support via disulphur bridges; the second ( $\beta$ -D-glucose oxidase) for labelling the antigen. Enzyme activity is measured in the presence of glucose oxidase by fixing the immunocomplex onto a  $pO_2$  electrode. After incubation of the antigen labelled with glucose oxidase and the free antigen with specific antibodies linked with ribonuclease, to reduce the pre-established concentration, the reaction medium is introduced into the continuous flow cell.  $O_2$  consumption due to the enzyme reaction is measured by the actual time that the electrode is in contact with a glucose standard solution. Cleavage of the disulphur bridges is caused by an injection of dithiotreitol solution. Treatment of the signal obtained is realized with an automatic micro-computer system. The preliminary results show that reproducibility with the same

membrane for ten measurements is less than 5%. Elution performed using dithiotreitol for example, shows that cleavage between the immunocomplex and the thiol-containing support is obtained after a few minutes, and 98% of the immunocomplex is eluted.

---

## INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, de nombreux dosages de substances présentes en faible concentration dans les liquides biologiques sont réalisés par des méthodes radio-immunologiques. Plus récemment, des méthodes enzymo-immunologiques ont été développées, susceptibles de remplacer la radio-immunologie en raison de leur sensibilité, de leur spécificité, et de leur reproductibilité. La possibilité d'utilisation de la réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) a fourni un outil analytique révolutionnaire, cela grâce à la spécificité de la réaction Ag-Ac. Initialement on a utilisé des Ag et des anticorps marqués radioactivement. Ce dosage radio-immunologique ou RIA a été proposé par Yalow et Berson en 1960 [1] pour le dosage de l'insuline plasmatique. Cette technique est encore actuellement beaucoup utilisée car elle permet de par sa grande sensibilité de procéder à des dosages d'antigènes ou d'anticorps présents en très faibles quantités, mais ce système présente quelques inconvénients: temps de vie des isotopes relativement court, radiations émises endommageant les molécules marquées. La mise en oeuvre de cette technique demande un appareillage coûteux et sophistiqué. Depuis, d'autres types de marqueurs ont été utilisés [2-5]: dans le cas de l'"Enzyme-immunoassay" ou EIA, l'enzyme est utilisée comme marqueur.

L'objet de ce travail est de développer un système de liaison immédiatement réversible permettant ainsi de doser pratiquement toutes les molécules immunologiquement actives dans les milieux biologiques ou industriels, en très peu de temps, sans avoir à changer le capteur lorsque l'on change de paramètres.

Pour cela, nous avons envisagé un système reposant sur la formation d'une liaison disulfure entre un support protéique modifié, déjà développé au laboratoire, et l'immunoréactant adapté [6].

Nous avons sélectionné parmi les différents systèmes utilisant le principe de la chromatographie d'affinité, c'est-à-dire la formation d'un complexe réversible entre deux substances en interaction, l'une étant le ligand lié au support, l'autre, la molécule à isoler, celui reposant sur la formation d'une liaison covalente entre le ligand et la substance à retenir. Cette liaison disulfure s'établira entre les groupes thiols de la membrane traitée au préalable avec un agent thiolant et entre les groupes thiols d'immunoglobulines G (IgG) réduites ou les groupes thiols d'une substance couplée aux IgG, en l'occurrence la ribonucléase réduite. Cette liaison pourra être rompue par un agent réducteur tel que le dithiotreitol.

La méthode enzymo-immunologique utilisée sera la méthode dite par compétition.

Lors de la réaction immunologique, l'antigène à doser et l'antigène couplé à la glucose oxydase sont pris en charge par les anticorps spécifiques complexés à la ribonucléase (RNase), et la solution réduite est introduite dans la cellule. Le complexe ainsi formé va contracter des liaisons disulfures avec la membrane artificielle thiolée fixée sur le capteur électrochimique. La quantité d'antigènes

présents dans la solution sera inversement proportionnelle à l'activité de la glucose oxydase en présence de glucose.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel*

Le système de mesure est composé: (i) d'un détecteur de  $pO_2$ , en l'occurrence une électrode de Clark, qui permet une mesure ampérométrique de la concentration en  $O_2$  (Radiometer G 54046/0); (ii) d'un analyseur de  $pO_2$  (Radiometer PHM71) connecté à l'électrode; (iii) d'une cellule de mesure que nous avons réalisée au Laboratoire de l'Université de Technologie. La gestion de ce circuit est effectué grâce à un microordinateur, type Apple II, et d'un enregistreur graphique connecté à l'analyseur.

La glucose oxydase (EC 1.1.3.4) type II à 18400 U/g et la ribonucléase qui présente une activité de 67 U/mg, proviennent de chez Sigma (St. Louis, MO, E.U.). La gélatine de porc provient des Laboratoires Rousselot (Ribecourt, France). Le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (DNB) et la 3,3'-diméthoxybenzidine ont été achetés chez Eastman Kodak (Rochester, NY, E.U.) Le glutaraldéhyde et les autres produits chimiques utilisés sont de grade analytique et proviennent de chez Merck (Darmstadt, R.F.A.).

### *Préparation du support protéique modifié*

*Choix du support.* De nombreuses membranes protéiques artificielles ont été utilisées pour l'immobilisation d'enzymes [7] et certaines d'entre elles ont été testées pour l'immobilisation d'Ac. La gélatine s'est révélée être le meilleur support protéique pour l'immobilisation d'Ac. En effet, la gélatine (d'ossein, ou de peau de porc), obtenue par hydrolyse acide a une structure qui permet une plus grande fixation de fonctions actives (fonctions aldéhydes) et par conséquent une plus grande possibilité de réaction avec les Ac sans trop perturber leurs propriétés immunologiques.

*Première étape de préparation.* On fait gonfler 5 g de gélatine de peau de porc dans 100 ml de tampon phosphate (pH 6,8, 0,1 M) pendant 1 h. La gélatine choisie (Rousselot) présente une force en gelée de 240 blooms, elle est utilisée à concentration de 5%, ce qui permet d'obtenir une bonne viscosité lors de l'hydrolyse.

La solution obtenue est ensuite placée dans un bain-marie à 50°C jusqu'à l'obtention d'une bonne solubilisation. On étale alors rapidement 1 ml de cette solution sur un film de polypropylène de 35 cm<sup>2</sup> de surface afin d'obtenir une bonne stabilité mécanique.

Le polypropylène aura été au préalable traité avec une solution de lauryl sulfate à 0,5% dans du tampon phosphate (pH 6,8, 0,01 M) afin d'augmenter l'adhérence du film de gélatine. Le séchage est ensuite effectué à l'air ambiant jusqu'à l'obtention d'un film sec. Trois facteurs sont fondamentaux pour l'obtention de bonnes membranes: (i) la température de solubilisation: si elle est trop élevée, il y a diminution de la viscosité (la gélatine s'étale mal) et de la force en gelée (la membrane se décolle et se fragilise en refroidissant); (ii) le temps de séchage doit être suffisamment long; (iii) la température de séchage ne doit pas être trop élevée (25–27°C).

### *Activation de la membrane de gélatine*

La membrane sèche est immergée dans une solution de glutaraldéhyde à 1% dans du tampon phosphate (pH 5,2, 0,01 M) pendant 5 min. L'excès de réactif est éliminé par plusieurs lavages successifs à l'eau distillée. Monsan a montré en 1975 [8] que le glutaraldéhyde réagissait sous forme d'un polymère insaturé, le polyglutaraldéhyde, pour donner des liaisons amines stabilisées par conjugaison (ce qui peut expliquer l'apparition d'une coloration jaune de la membrane après tannage) entre deux résidus amines de lysine. La distribution des groupes aldéhydiques tout au long de la molécule de polyglutaraldéhyde alliée à la relative flexibilité de cette molécule, augmente la probabilité de rencontre et donc de réaction entre la protéine à coupler et le support amine (la gélatine en moyenne contient 35 résidus amines (lysine) pour 1000 résidus).

La taille de ce polyglutaraldéhyde est fonction du pH du milieu et de la concentration en glutaraldéhyde. Les deux valeurs choisies ici correspondent à l'obtention du plus grand nombre de fonctions aldéhydiques fixées.

### *Thiolation de la membrane et principe du système réversible (Fig. 1)*

La membrane tannée est plongée dans une solution de cystéine 0,2 M dans l'eau distillée pendant 1 h. Le résidu aminé de la cystéine va réagir avec le groupement thiol nécessaire à l'établissement de la liaison disulfure désirée. D'autres agents de thiolation, tels que la N-acétylhomocystéine thiolactone, l'anhydride acétyl mercaptosuccinique, le mercaptobutyrimidate et le SPDP [N-succinimydil-3-(2-pyridyldithio)propionate], réagissent avec les résidus amines des protéines et nécessitent souvent plusieurs étapes de réaction.

### *Préparation des IgG de lapin réduits*

On pratique le procédé employé par Kato et al. en 1976 [9] utilisant les groupes thiols obtenus par réduction pour l'introduction de résidus maléide dans les molécules d'IgG. Dans notre cas, les thiols obtenus serviront à l'établissement d'une liaison disulfure avec le support thiolé; Seelig et Meister [10] ont utilisé ce même principe en 1982, le support thiolé étant une colonne de Sepharose 4B.

Les IgG de lapin (30 mg) sont solubilisées dans 5 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 5) et incubées avec 75 mM 2-mercaptoéthylamine à 37°C pendant 90 min.

Le mélange réactionnel, après refroidissement, est ensuite passé sur une colonne de Sephadex G-25 (40 × 1,5 cm I.D.) équilibrée avec du tampon phosphate (0,1 M, pH 5) afin de séparer les IgG réduites des composants de bas poids moléculaire. L'absorbance à 280 nm des fractions obtenues (3 ml chacune) est mesurée contre le tampon utilisé pour l'élution.

Les fractions réduites sont éluées à peu près dans le volume mort de la colonne (ici égal à 20 cm<sup>3</sup>) avec un rendement élevé (rapport de la surface du pic des IgG réduits à la surface du pic des autres composants).

### *Préparation des conjugués anticorps de chèvre et IgG de lapin couplés à la glucose oxydase*

On utilise la méthode de couplage au glutaraldéhyde en deux étapes

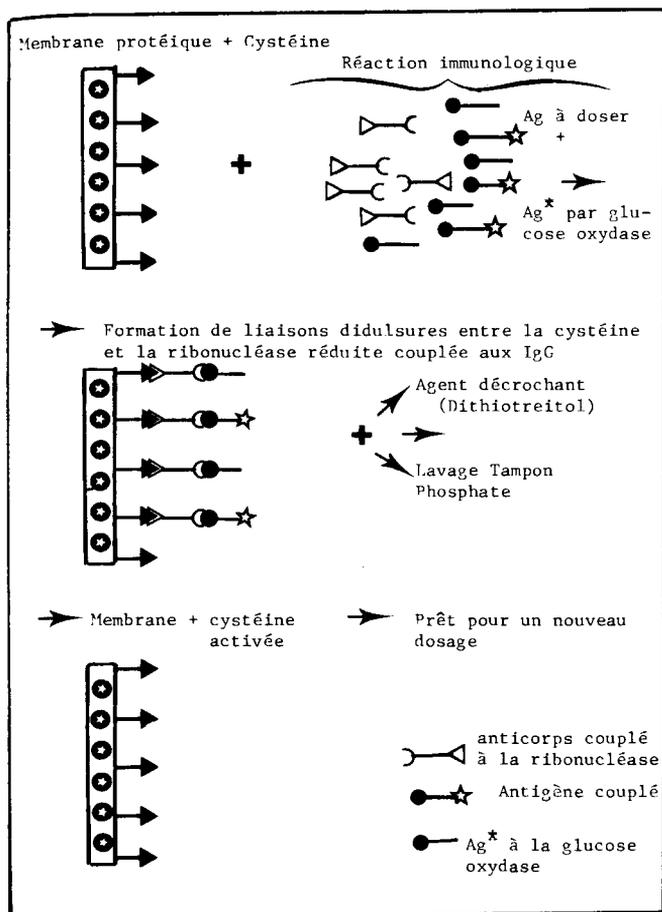


Fig. 1. Représentation schématique du principe de dosage réversible à partir de la méthode dite par compétition.

d'Avrameas et Guilbert [11]. Cette méthode donne des conjugués très stables et une activité enzymatique et immunologique meilleure que celle obtenue avec les techniques de conjugaison utilisant le periodate de sodium, la *p*-benzoquinone ou les carbodiimides solubles dans l'eau. L'utilisation de deux étapes permet d'obtenir des conjugués avec un rapport enzyme/IgG de 1, ce qui n'est pas le cas avec la méthode en une étape.

La première étape est l'activation de la glucose oxydase par le glutaraldéhyde: 10 mg de glucose oxydase (à 16,1 I.U.) sont mis en contact avec 1,00 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6,8) contenant 1,25% de glutaraldéhyde pendant 18 h à température ambiante.

On effectue ensuite une séparation de l'enzyme activée par gel filtration sur colonne de Sephadex G-25 (30 × 1,5 cm I.D.). Les fractions sont éluées avec 0,15 M NaCl, analysées spectrophotométriquement à 280 nm. Les fractions correspondant à l'enzyme activée (en général fraction de 3 ml, Nos. 5-6 ou 6-7) sont concentrées à l'aide de PEG 2000 (polyéthylène glycol 2000, Serva).

Les rendements de filtration obtenus ont été de 72, 75, 87 et 92%.

La deuxième étape est la mise en contact de l'enzyme activée avec 2 mg

d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin dans 0,5 ml de tampon carbonate (pH 9,5, 0,1 M) 24 h à 4°C. On ajoute ensuite 0,5 ml de lysine 0,2 M (elle bloque les groupes réactifs restés libres). Après 2 h à 4°C, on effectue une dialyse dans un grand volume de tampon phosphate (pH 6,8, 0,01 M) toujours à 4°C. On effectue ensuite une purification des conjugués enzymatiques par gel filtration sur une colonne de Sephadex G-200 équilibrée avec du tampon phosphate (pH 6,8, 0,01 M).

#### *Couplage de la ribonucléase aux anticorps*

Le but est d'obtenir des conjugués ayant un rapport enzyme/IgG très en faveur de la RNase afin de pouvoir disposer d'un grand nombre de groupes thiols libres après réduction. Trois méthodes de couplage ont été étudiées: glutaraldéhyde en une étape, carbodiimide soluble dans l'eau et *p*-benzoquinone. On a procédé à chaque fois, soit en utilisant l'enzyme déjà réduite, soit en effectuant la réduction après couplage.

*Méthode au carbodiimide.* Cette méthodologie est dérivée de la technique décrite par Nakane et al. en 1967 [12] pour le couplage de la phosphatase acide à des IgG. Une solution de RNase (4 ml) réduite à 2,4 mg/ml réagit avec 5 mg d'IgG et 20 mg d'1-éthyl-2-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide dans 0,5 ml d'eau distillée, pendant 30 min à température ambiante sous agitation douce. Une dialyse contre une solution saline à 0,5% pendant une nuit est ensuite effectuée. Une purification simple du conjugué est obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium. Pour la préparation du conjugué en utilisant de la RNase non réduite (10 mg), le protocole est le même que précédemment ainsi que la méthodologie utilisée pour la réduction de la RNase couplée qui se termine par une filtration sur Sephadex G-25.

*Méthode au glutaraldéhyde en une étape.* La ribonucléase (10 mg) est mise en présence de 5 mg d'IgG dans une solution contenant 0,5 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6,8) avec 0,05 ml d'une solution aqueuse à 1% de glutaraldéhyde, pendant 2 h à température ambiante.

Après dialyse contre une solution de tampon phosphate (0,01 M, pH 6,8) à 4°C, les IgG sont précipitées et purifiées en présence d'une solution de sulfate.

*Méthode à la p-benzoquinone.* Les conjugués obtenus par une méthode décrite par Ternynck et Avrameas [13] se sont révélés instables, une coloration brune apparaissant après quinze jours de stockage à l'abri de la lumière.

## RÉSULTATS

Le principe des réactions chimiques qui régissent le système et la formation de liaisons disulfures sur la membrane protéique thiolée, est montré sur la Fig. 2. Nous prendrons comme "Modèle Biologique" dans ce système des IgG de chèvre anti-IgG de lapin comme anticorps et comme antigène des IgG de lapin.

#### *Réalisation d'une mesure automatique*

La membrane thiolée est découpée en disque de même diamètre, puis déposée sur l'anode de l'électrode à  $pO_2$  dans la cellule de mesure. Après 1 h d'incubation d'antigènes à doser et d'antigènes couplés à la glucose oxydase



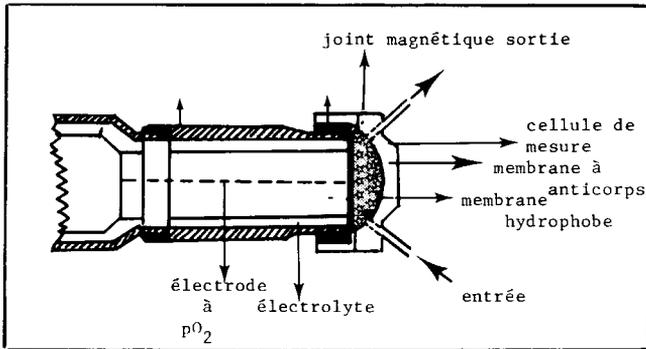


Fig. 3. Schéma d'une électrode enzymo-immunologique réalisée à partir d'une électrode à  $pO_2$ .

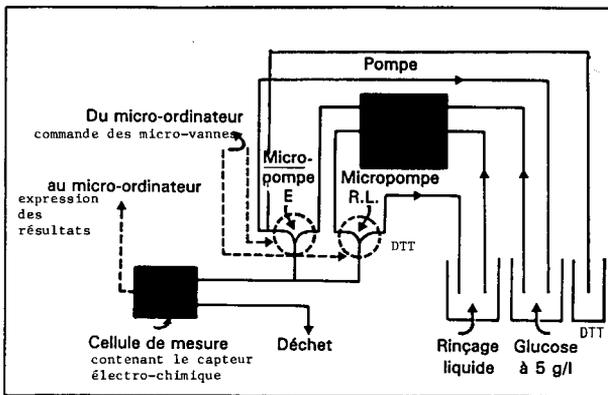


Fig. 4. Représentation schématique du circuit fluide permettant la réalisation en continu de dosage immunologique.

(ii) Le conjugué B est obtenu par couplage de l'IgG avec la ribonucléase réalisé par la méthode au carbodiimide, la ribonucléase ayant été réduite précédemment.

(iii) Le conjugué C sera obtenu à partir d'IgG couplées à la ribonucléase non réduite selon la technique au carbodiimide. La quantité de groupements thiols obtenue sur ces différents conjugués est étudiée dans le Tableau I. Les concentrations correspondent à 100  $\mu$ l de conjugué. La moyenne est obtenue à partir de trois déterminations pour chaque type de conjugués.

TABLEAU I

ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION EN GROUPEMENTS THIOLS DISPONIBLES SUR LES CONJUGUÉS IgG—RNase A, B ET C

	Concentration de SH ( $\mu$ mol/ml)		
	A	B	C
Initial	102.4	6.34	29.4
Après quinze jours de stockage	29.4	1.98	17.2
Après trente jours de stockage	14.7	1.91	7.35

Les conjugués préparés avec de la RNase non réduite présentent après réduction une plus grande concentration en groupes thiols que ceux préparés avec de la RNase déjà réduite. Il est possible en effet qu'une réduction concomitante des IgG se fasse lors de la réduction de la RNase couplée.

Les conjugués préparés à l'aide de glutaraldéhyde avec de la RNase non réduite au départ possèdent un plus grand nombre de groupes thiols que ceux préparés avec le carbodiimide. C'est l'inverse si l'on utilise la RNase déjà réduite.

On notera une forte diminution des groupes SH surtout au cours des premiers jours de stockage.

*Interprétation des courbes d'étalonnage obtenues par chaque type de conjugué IgG-RNase testé (Fig. 5).*

Les valeurs des activités glucose oxydase sont encore assez faibles même lorsqu'on utilise des conditions optimales de dosage (dilution du conjugué glucose oxydase au 1:10) puisque la valeur maximale obtenue est 0,70 mV/min, alors qu'une activité satisfaisante, dans des conditions identiques de dilution de conjugué, se situe entre 1 et 2 mV/min.

Pour les conjugués A et C, l'activité glucose oxydase obtenue est proportionnelle au logarithme de la dilution du conjugué glucose oxydase, jusqu'à 1:50; pour une dilution supérieure, la courbe s'infléchit; pour le conjugué B, la proportionnalité s'arrête au 1:20. Ce sont les courbes de calibration obtenues

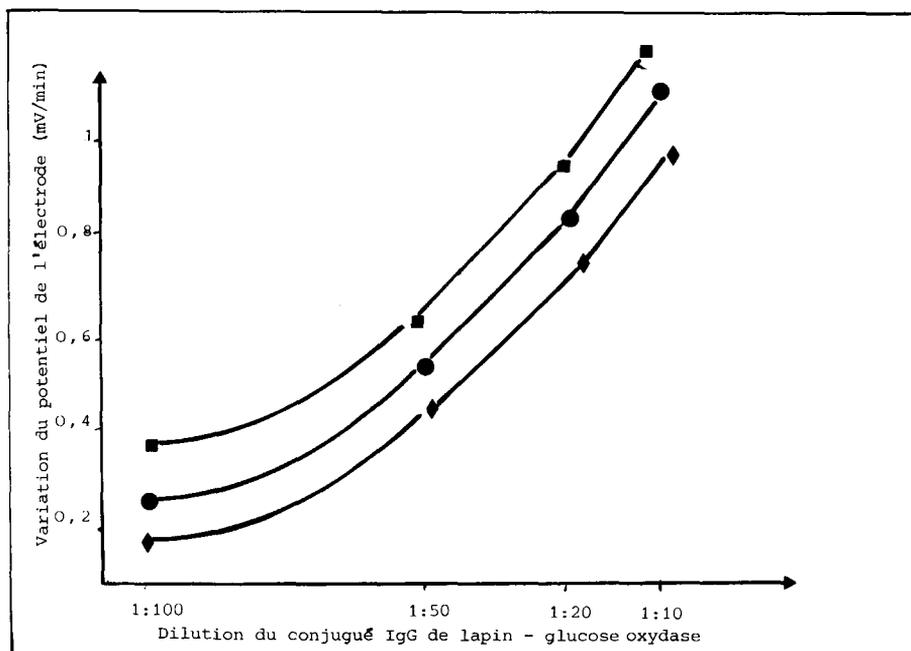


Fig. 5. Variation du signal de l'électrode en fonction de différentes concentrations (dilution) du conjugué IgG - glucose oxydase pour chaque type de conjugué. (■) Conjugué A, préparé au glutaraldéhyde avec RNase non réduite; (●) conjugué B, préparé au carbodiimide avec RNase réduite; (◆) conjugué C, préparé au carbodiimide avec RNase non réduite.

avec les conjugués A et C qui présentent les plus fortes valeurs d'activité glucose oxydase.

*Influence du temps de contact des IgG de chèvres anti-IgG de lapin et IgG de lapin couplées à la glucose oxydase conjugués avec la membrane*

Nous avons obtenu des résultats très voisins de ceux mentionnés précédemment pour des temps compris entre 15 et 60 min. Par contre, pour des temps inférieurs, l'activité glucose oxydase est à peine détectable.

*Reproductibilité des mesures*

Pour huit à dix mesures faites de façon consécutive sur chaque membrane et pour chaque type de conjugué RNase-IgG envisagé, le pourcentage de variation a toujours été trouvé inférieur à 5%, ce qui est satisfaisant.

Par contre, en ce qui concerne différentes membranes préparées dans les mêmes conditions, on note une grosse variation de la reproductibilité, et ceci a été observé pour chaque type de conjugué IgG—RNase réduite.

*Activité glucose oxydase obtenue avec le système des IgG réduites*

En moyenne les résultats obtenus avec le système des conjugués IgG—RNase réduites sont 30 à 60 fois plus élevés que ceux fournis par le système des IgG réduites.

Afin de vérifier la concentration en groupements thiols des différents conjugués, une détermination colorimétrique a été effectuée suivant la technique dite au DMB (3,3'-diméthoxybenzidine). 100  $\mu$ l de double conjugué (50  $\mu$ l de conjugué RNase—IgG de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 1:10 et 50  $\mu$ l de conjugué IgG de lapin couplé à la glucose oxydase dilué au 1:10) sont incubés en présence de la membrane thiolée pendant 15 min. Après un lavage soigneux, cette membrane est immergée dans 3 ml de DMB.

Les pentes de cinétiques de la glucose oxydase obtenues sont ensuite rapportées à la courbe d'étalonnage de l'activité de la glucose oxydase en solution. Cela permet de calculer les pourcentages de fixation membranaire obtenus pour chaque type de conjugués RNase—IgG.

Pour les conjugués A, B et C, les pourcentages de fixation sont respectivement de 35, 17 et 41%. Les résultats présentés sont une moyenne de quatre essais.

Ces données compatibles avec celles trouvées par détection ampérométrique, montrent aussi que les conjugués A et C conduisent aux meilleurs résultats.

Ce sont les conjugués A et C qui donnent dans l'ensemble les meilleurs

TABLEAU II

TABLEAU RECAPITULATIF CONCERNANT LES CONJUGUÉS IgG—RNase A, B ET C

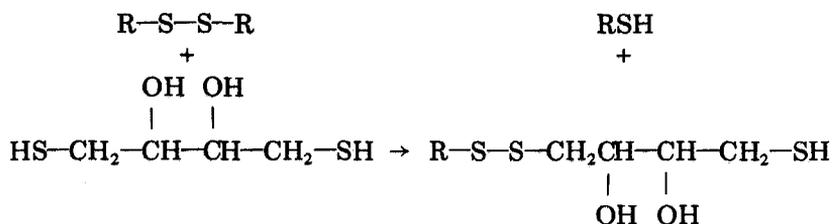
	A	B	C
Présence de thiols libres	+++	+	++
Test à l'immunodiffusion	++	+	+
Activité glucose oxydase maximale (mmHg/s)	0.57	0.42	0.7
Pourcentage de fixation par test au DMB	35	17	19.5

résultats. On remarque que ce sont ceux pour lesquels la réduction de la RNase est effectuée après le couplage. La réduction concomittante des IgG, très probable, augmente le pouvoir de fixation des conjugués IgG—RNase sur la membrane thiolée.

Le choix entre le conjugué A et C est difficile, mais à priori, le conjugué C serait préférable puisqu'il présente des valeurs plus élevées d'activité glucose oxydase. Mais pour un choix final, il importe de tenir compte de la stabilité pendant le stockage.

#### *Étude du clivage de la liaison disulfure*

Selon Cuatrecasas [14], le DTT est l'un des meilleurs agents de réduction des ponts disulfures. La réduction s'effectue selon le schéma suivant:



Seelig et Meister [10] l'ont utilisé à une molarité de 25 mM pour cliver les liaisons disulfures établies entre des IgG réduites et du Sepharose thiolé. Nous avons suivi la procédure réactionnelle suivante: (i) mise en contact de 100  $\mu\text{l}$  de double conjugué (50  $\mu\text{l}$  de conjugué C dilué au 1:10, 50  $\mu\text{l}$  de conjugué glucose oxydase dilué au 1:10) pendant 15 min avec la membrane thiolée; (ii) passage de tampon phosphate (pH 6,8, 0,01 M); (iii) mesure de l'activité glucose oxydase 1 ( $A_1$ ) par passage du substrat; (iv) passage du dithiotreitol 25 mM pendant divers temps; (v) passage de tampon phosphate (pH 6,8, 0,01 M) pendant au moins 5 min; (vi) mesure de l'activité glucose oxydase 2 ( $A_2$ ) après passage du substrat; (vii) le pourcentage de double conjugué désorbé ( $P'$ ) est défini par  $P' = (A_1 - A_2)/A_1 \times 100$ .

Les résultats préliminaires obtenus montrent qu'après 2 min on décroche 72% du complexe, 7 et 15 min 100%; ces résultats sont très encourageants et nous permettent de supposer qu'en augmentant la molarité du DTT, on pourrait diminuer le temps nécessaire à la rupture complète de l'immuno-complexe.

#### CONCLUSION

L'utilisation des systèmes réversibles basés sur le principe d'une liaison disulfure pour un dosage immuno-enzymatique de substances antigéniques par compétition et à révélation ampérométrique nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires encourageants. Le meilleur système est celui utilisant un conjugué IgG—RNase réduite par un couplage au carbodiimide.

L'optimisation de la fixation des conjugués IgG—RNase réduits sur la membrane thiolée devrait permettre d'une part, à améliorer la reproductibilité des mesures pour différentes membranes et sur un grand nombre de mesures, d'autre part à augmenter le seuil de sensibilité du système.

La réduction du temps de réaction du DTT avec la membrane en dessous des 5 min, et la régénération continue du support protéique permettront d'effectuer rapidement, sans changement du capteur, pratiquement tous les dosages de substances immunologiquement actives dans les liquides biologiques et industriels.

## RÉSUMÉ

Les auteurs proposent l'utilisation de capteurs spécifiques immobilisés par des ligands sur des membranes protéiques artificielles, et l'élaboration d'un système informatisé pour la détermination de différents antigènes, haptènes ou anticorps dans les liquides biologiques suivant le principe des techniques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). Deux enzymes sont utilisées dans cette technique: la première, la ribonucléase, qui une fois réduite forme des ponts disulfures de manière réversible avec son inhibiteur fixé sur la matrice insoluble, la deuxième, la  $\beta$ -D-glucose oxydase, qui sert de marqueur enzymatique. L'activité enzymatique est mesurée en présence de glucose oxydase, l'immunocomplexe étant fixé sur une électrode à  $pO_2$ . Après incubation de l'antigène couplé à la glucose oxydase, et de l'antigène à doser avec les anticorps correspondants couplés à la ribonucléase réduite, en concentration pré-établie, le milieu réactionnel est introduit dans la cellule de mesure. La cinétique de la glucose oxydase est obtenue en présence d'une solution standard de glucose. La rupture des ponts disulfures de l'immunocomplexe est obtenue après injection de dithiotreitol (DTT). Les résultats préliminaires montrent que le pourcentage de variation avec la même membrane pour dix mesures consécutives est inférieur à 5%. L'élution de l'immunocomplexe avec le DTT par exemple, montre que la rupture avec les groupements thiols fixés sur le capteur est obtenue après quelques minutes et 98% de l'immunocomplexe est élué.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 R.S. Yallow et S.R. Berson, *J. Clin. Invest.*, 39 (1960) 1157.
- 2 J. Haimouich, E. Hurwitz, N. Nouik et M. Sela, *Biochim. Biophys. Acta*, 207 (1970) 115.
- 3 R.K. Leute, E.F. Vumann, A. Goldstein et L.A. Herzenberg, *Nature*, 236 (1972) 93.
- 4 J. Aalberse, *Clin. Chim. Acta*, 48 (1972) 109.
- 5 H.R. Schroeder, P.O. Vogelhut, R.K.J. Carrico et R.C. Boguslaski, *Anal. Chem.*, 48 (1933) 124.
- 6 J.L. Boitieux, G. Desmet et D. Thomas, *Clin. Chim. Acta*, 88 (1977) 329.
- 7 J.L. Boitieux, G. Desmet et D. Thomas, *FEBS Lett.*, 93 (1978) 133.
- 8 P. Monsan, *Biochemistry*, 11 (1975) 57.
- 9 K. Kato, Y. Hamagushi, M. Fukui et E. Ishikawa, *J. Biochem.*, 78 (1975) 235.
- 10 G.F. Seelig et A. Meister, *J. Biol. Chem.*, 257 (1982) 5092.
- 11 S. Avrameas et B. Guilbert, *C.R. Acad. Sci.*, 273 (1971) 2705.
- 12 P.K. Nakane, R. Sri et G.B. Pierce, *J. Histochem. Cytochem.*, 14 (1966) 55.
- 13 T. Ternynck et S. Avrameas, *Ann. Immunol.*, 1270 (1976) 197.
- 14 P. Cuatrecasas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33 (1968) 235.