REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 476 320**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) N° **80 03440**

(54) **Nouveau réactif immunologique pour la détection en tubes du facteur rhumatoïde dans un échantillon biologique et procédé de préparation de ce nouveau réactif.**

(51) Classification internationale. **(Int. Cl. 3) G 01 N 33/54//A 61 B 10/00.**

(22) Date de dépôt ..... 15 février 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande ..... B.O.P.I. — «Listes» n. 34 du 21-8-1981.

(71) Déposant : GUFFROY René, résidant en France.

(72) Invention de : René Guffroy.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

NOUVEAU REACTIF IMMUNOLOGIQUE POUR LA DECTECTION EN TUBES DU FACTEUR RHUMATOÏDE DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE ET PROCEDE DE PREPARATION DE CE NOUVEAU REACTIF

L'invention concerne un nouveau réactif permettant la mise en évidence in vitro du "facteur rhumatoïde" dans un sérum ou un échantillon biologique analogue, la technique de mise en évidence elle-même, ainsi qu'un procédé de fabrication de ce réactif.

On sait que le sérum des malades atteints de polyarthrite rhumatoïde contient une globuline apparentée au groupe de β2 macroglobulines qui sont appelées macroglobulines IgM.

Cette macroglobuline couramment appelée "facteur rhumatoïde" se caractérise en particulier par ses propriétés agglutinantes ou hémagglutinantes vis-à-vis de complexes formés par des antigènes globulaires, notamment constitués par des globules rouges sanguins (ou hématies), et leurs iso-ou hétéro-immunsérums correspondants pris en doses sub-agglutinantes. C'est le principe de la réaction de WAALER-ROSE ou des réactions qui en dérivent et qui sont considérées comme les plus spécifiques de la polyarthrite chronique évolutive (PCE).

Pour la clarté de l'exposé qui suit, il est proposé d'emblée de définir ce que désigneront respectivement dans ce qui suit les expressions "agglutination" et "hémagglutination", d'une part, et "titre d'agglutination", d'autre part.

Les expressions "agglutination" ou encore "agglutination sur lame" seront utilisées pour désigner la réaction visible à l'oeil nu qui peut être observée sur une lame, lorsque l'on met en présence un réactif contenant un complexe tel que défini ci-dessus avec un sérum contenant le facteur rhumatoïde. On utilisera également encore l'expression "agglutination" lorsque l'on mettra en contact des antigènes globulaires, notamment globules rouges sanguins ou hématies, avec une dose d'immunsérum suffisant à produire cette réaction d'agglutination.

On utilisera l'expression "hémagglutination" pour désigner le phénomène que constitue la formation d'un "tapis" ("mat pattern" selon l'expression anglaise

couramment utilisée pour désigner ce phénomène) lorsque l'on met en contact dans ce tube une solution diluée du susdit complexe avec une solution, généralement elle-même diluée, du sérum à tester lorsque celui-ci contient le facteur rhumatoïde. Comme précédemment, le même phénomène peut être observé, lorsque l'on met en présence les constituants initiaux entrant dans la formation du complexe, c'est-à-dire l'antigène globulaire avec une dilution hyperhémagglutinante de l'immunsérum correspondant, c'est-à-dire avec une dilution inférieure à celle qui correspond au titre d'hémagglutination, tel qu'il est défini ci-après, donc avec un excès d'immunsérum.

Au contraire, l'absence du facteur rhumatoïde dans le sérum testé ou encore la mise en contact de l'antigène globulaire avec une dilution "sub-agglutinante" de l'immunsérum, se traduisent par une simple sédimentation des globules de l'antigène globulaire, ceux-ci se concentrant alors dans le fond du tube. Cette "hémagglutination", ou au contraire cette "sédimentation" (traduisant l'absence d'hémagglutination) se reconnaissent aisément lorsque les mises en contact susdites sont effectuées dans les éléments de tubes des microplaques couramment utilisées dans les laboratoires. On sait que ces tubes comportent en général une partie supérieure cylindrique et/ou se terminant par un fond conique. Dans le cas de l'hémagglutination, on peut observer au bout d'un certain temps la formation d'un "tapis" ("mat pattern") recouvrant en général sensiblement la totalité du fond conique, tandis qu'au contraire la "sédimentation" se manifeste par la concentration en un "bouton" étroit des antigènes globulaires à l'extrême pointe de ces mêmes tubes.

L'expression "titre d'agglutination" sera utilisée pour désigner la dernière dilution donnant sur lame des agglutinats visibles à l'oeil nu, en d'autres termes, la dilution située juste avant la première dilution plus importante qui n'induira plus la formation desdits agglutinats (réaction négative).

De même, on désignera par "titre d'hémagglutination" la dernière dilution qui, en tube, conduit à la formation du susdit "tapis" ou "mat pattern", c'est-à-dire la

dilution précédant celle plus importante, pour laquelle on n'observera alors plus qu'une "sédimentation".

Le "titre d'agglutination" s'avère nettement plus faible que le "titre d'hémagglutination", dans un rapport qui, approximativement, peut être de l'ordre de 1 à 40 dans le cas d'hématies de mouton formolées et de sérum hémolytique de lapin anti-mouton.

Les deux techniques, à savoir "agglutination sur lame" et "hémagglutination en tube ou microplaque", sont utilisées dans l'état de la technique.

La première technique (agglutination sur lame) est aisée à mettre en oeuvre. L'agglutination donne une indication qualitative rapide de la présence ou non dans le sérum testé du facteur rhumatoïde.

La deuxième technique (hémagglutination en tube ou microplaque) est capable de donner en outre des indications approximativement quantitatives quant à la teneur du facteur rhumatoïde du sérum testé, notamment grâce à la détermination possible du seuil de dilution qui sépare celle des dilutions la moins élevée qui entraîne la formation du "tapis" ou "mat pattern" et celles des dilutions plus élevées, pour lesquelles on observe une sédimentation.

Il est bien connu que l'une des difficultés que l'on a rencontrées dans le passé en ce qui concerne le test sur lame, et qui dans la pratique n'est pas à ce jour résolue dans le cas des tests en tubes ou microplaques, consistent dans l'instabilité des complexes naturels que forment les antigènes globulaires ou hématies avec les anticorps des immunsérums correspondants.

Cette difficulté a été surmontée dans le cas des réactifs destinés aux tests sur lame.

Il est connu que MILGROM et ses collaborateurs (Arthritis and Rheumatism .. 7 (1) pages 1 à 7 (1964)) ont proposé, pour tenter de remédier aux difficultés de mise en oeuvre du test sur lame initialement mis au point par WAALER et ROSE, d'avoir recours à un complexe formé d'hématies de mouton qui avaient auparavant été soumises à un traitement de formolation et d'un sérum de lapin anti-hématies de mouton, pris à une dilution quatre fois inférieure à la dilution la plus élevée induisant, dans un

dosage en tube, une hémagglutination en tapis (en d'autres termes, quatre fois inférieure au titre d'hémagglutination). selon MILGROM, le réactif obtenu peut être conservé pendant quelque temps, notamment deux mois, à 4°C, ou à l'état congelé, sans pertes appréciables d'activité sérologique. Toujours selon ces auteurs, le réactif ainsi formé permet, lorsqu'il est mis en contact sur lame avec un sérum humain dilué vingt fois au sein d'un tampon isotonique de chlorure de sodium, de déceler la présence du facteur rhumatoïde, par agglutination de ce réactif lorsque le facteur rhumatoïde est présent, après un maintien au repos du mélange à la température ambiante pendant une durée de cinq à dix minutes. Une telle réaction reste cependant trop lente dans la pratique, surtout si l'on tient compte de la vitesse avec laquelle le milieu liquide de suspension tend à s'évaporer, à partir de l'instant où le mélange est placé sur la lame.

Le brevet français n° 1.484.727 et son certificat d'addition n° 92.415 décrivent un réactif perfectionné permettant cette fois-ci une réaction quasi instantanée sur lame lorsque le facteur rhumatoïde est présent dans le sérum testé. Il se caractérise par la présence, dans le complexe antigène-anticorps soluble, d'une concentration beaucoup plus élevée en anticorps, ce qui peut être atteint grâce aux procédés perfectionnés décrits dans ces titres de propriété industrielle, procédés qui consistent à soumettre le complexe préalablement formé entre l'immunsérum et les antigènes globulaires, notamment hématies de mouton (lesquelles avaient antérieurement subi ou non un traitement par le formol ou un aldéhyde analogue), à un post-traitement de stabilisation par le formol ou aldéhyde analogue. Ce perfectionnement présente un caractère essentiel, en ce que le réactif formé est d'une utilisation aisée, la réaction recherchée, lorsqu'elle se produit, s'effectuant avant que le mélange étalé sur la lame ait eu le temps de sécher.

Si le problème de la réalisation d'un réactif efficace et stable a été résolu de façon satisfaisante pour ce qui est des tests de diagnostic sur lame de la pré-

sence ou non du facteur rhumatoïde, il n'en est pas toujours encore ainsi pour ce qui concerne les réactifs utilisés pour le test en tubes ou microplaques. En effet, les réactifs décrits dans la littérature pour le test sur lame présentent la caractéristique de donner lieu spontanément à la formation des hémagglutinations en tapis, en présence ou non du facteur rhumatoïde. Ils sont donc inutilisables dans des essais de détection de ce facteur dans des sérums susceptibles de le contenir, voire d'en être exempts.

Certes MILGROM rapporte des essais préliminaires mettant en jeu des hématies prétraitées par le formol et sensibilisées par une dilution sub-hémagglutinante d'un sérum de lapin anti-mouton. La technique décrite n'est cependant jamais entrée dans la pratique, ne serait-ce que pour le motif que la teneur en anticorps du complexe ainsi formé est excessivement faible, en raison de la déspécification importante des sites antigéniques initialement présents dans les hématies, sous l'effet de la formolation antérieure desdites hématies.

De toute façon, un tel réactif n'était pas de nature à discriminer sérieusement le facteur rhumatoïde, éventuellement présent, des hétéro-anticorps naturels (anti-hématies de mouton ou anticorps de FORSMAN) présents dans tous les sérums humains à des titres élevés, dont on connaît la capacité qu'ils ont d'également produire des hémagglutinations, et ce, même si on a eu soin de procéder à une adsorption préalable des sérums à tester dans le but d'éliminer les anticorps parasites.

L'invention a pour but de remédier aux difficultés qui précèdent, plus particulièrement de fournir un réactif à la fois stabilisé et sélectif pour la détection du facteur rhumatoïde dans des essais en tubes ou microplaques mettant en jeu une hémagglutination, sans qu'il soit nécessaire de procéder dans des gammes de dilution extrêmes du sérum et de lui faire subir une adsorption préalable des anticorps parasites susceptibles de masquer le facteur rhumatoïde.

Le complexe stabilisé selon l'invention, formé à

partir d'antigènes globulaires, notamment d'hématies,d'une part, et d'anticorps solubles à l'égard de ces anti-antigènes globulaires, tels qu'ils sont susceptibles d'être fournis par un immunsérum préparé au préalable à l'égard desdits antigènes globulaires, d'autre part, ce complexe étant approprié pour la détection du facteur rhumatoïde dans des essais en tubes ou microplaques, est caractérisé en ce qu'il contient une quantité relative d'anticorps conférant à ce complexe un seuil de sensibilité par rapport au Sérum Standard International de polyarthrite rhumatoïde de l'OMS se situant entre environ 0,01 et 1 UI/ml, notamment entre environ 0,05 et 0,30 UI/ml, ce qui correspond comme seuil de détection du facteur rhumatoïde dans un sérum dilué au 40ème respectivement aux intervalles d'environ 0,4 à 40 UI/ml et d'environ 2 à 12 UI/ml, et en ce qu'il est stabilisé au point de ne pas donner lieu à une hémagglutination spontanée en l'absence de facteur rhumatoïde, notamment en présence d'un sérum exempt de facteur rhumatoïde.

Le complexe selon l'invention peut également être défini pour ce qui est de la teneur relative en anticorps qu'il retient par rapport à la teneur relative maximum qui peut être fixée sur des antigènes globulaires analogues n'ayant pas subi le traitement conforme au procédé selon l'invention, tel qu'il sera défini plus loin, en l'absence d'hémagglutination. En particulier, la teneur relative en anticorps du complexe selon l'invention se situe entre environ 2 et environ 20, de préférence environ 3 et environ 10 unités hémagglutinantes, étant entendu que l'unité hémagglutinante correspond à la teneur relative en anticorps susceptible d'être retenue par les antigènes globulaires correspondants n'ayant pas subi de traitement selon l'invention, en l'absence d'hémagglutination.

Le procédé selon l'invention pour obtenir le complexe sus-indiqué est caractérisé en ce que les antigènes globulaires retenus et qui serviront de support pour les anticorps provenant d'immunsérums correspondants font l'objet :

- d'au moins deux traitements successifs avec deux agents respectivement distincts du type aldéhyde ou agent tannant du type de ceux qui sont capables de former avec l'hémoglobine des hématies une combinaison entraînant une transformation chimique de l'hémoglobine, notamment sous forme d'un composé brunâtre, le premier et, éventuellement même

le second de ces traitements étant effectués avant la mise en contact de ces antigènes globulaires avec les anticorps destinés à être retenus sur ceux-ci et,

- un traitement par au moins une substance notamment de type protidique telle que l'albumine ayant des propriétés *dispersives*, c'est-à-dire permettant à cette substance d'entrer en compétition avec les anticorps sensibilisants :
  - en se fixant sur la membrane du globule rouge ;
  - ou en se combinant avec les anticorps dans le cas où le complexe immunologique globules rouges (ayant subi un traitement avec un agent du type aldéhyde ou avec un agent tannant)-anticorps est traité par un agent du type aldéhyde ou par un agent tannant en présence d'albumine.

Le traitement avec la substance telle que l'albumine peut être réalisé simultanément avec le traitement final par le premier type d'agent sus-mentionné (ou tout traitement avec un tel agent en sus des deux traitements minima envisagés ci-dessus) ou séparément à titre de traitement final. Avantageusement, les agents du type aldéhyde ou agent de tannage sont choisis parmi l'aldéhyde formique, le glutaraldéhyde, l'aldéhyde pyruvique ou aldéhyde analogue, l'agent préféré étant le glutaraldéhyde ou encore, en ce qui concerne plus particulièrement les agents tannants, l'acide tannique, les tanins végétaux et synthétiques, la para benzoquinone, l'acide sulfosalicylique, les substances tannantes d'origine minérale telles que sels de chrome, chlorure de chrome, zirconium, silicate de soude, hyposulfite de soude, etc.

En ce qui concerne le deuxième type de substance, on peut avoir recours à la place de l'albumine, plus particulièrement à la sérum-albumine bovine à d'autres substances de même nature albuminoïde en particulier au sérum d'autres espèces animales ou au sérum humain ou à des fractions albumine α et β globulines isolées de ces sérums, ou à l'une quelconque des protéines du lait ou à l'un quelconque de leur mélange.

D'autres substances peuvent jouer à un degré moindre un rôle uniquement dispersant en particulier dans la zone de sensibilisation comprise entre 2 et 5 unités hémagglutinantes de sérum hémolytique ; ce sont le polyvinyle pyrrolidone connu notamment sous la désignation Subtosan, les émulsifiants de type anionique, cationique ou non ionique, le déplacement vers les pH alcalins jusqu'à environ 9,2 pouvant être avantageux.

Avantageusement, le traitement avec la substance protidique et dispersante est effectué à une température supérieure à 37°C, de préférence entre 50 et 60°C à un pH compris entre environ 7 et environ 8,5. De même, les traitements avec les aldéhydes ou agents tannants, de préférence le dernier de ces traitements, sont effectués dans les mêmes conditions de température et de pH.

Ces divers traitements s'effectuent en suspension, les concentrations relatives des agents mis en oeuvre correspondant avantageusement à celles qui sont indiquées plus loin dans les exemples.

L'invention prend avantage de l'effet inattendu induit par l'albumine ou autre substance protidique ou dispersante, et en particulier de la combinaison de l'albumine, ou d'une autre substance protidique ou dispersante avec le glutaraldéhyde, notamment lorsqu'elle est utilisée dans les conditions qui ont été définies ci-dessus, de déplacer vers les faibles dilutions le seuil au-délà duquel il n'est plus possible d'éviter l'hémagglutination spontanée à bref délai des complexes formés par la mise en contact des teneurs relatives correspondantes d'antigènes globulaires, notamment d'hématies, et d'anticorps correspondants, sans pour autant influencer de façon défavorable la sensibilité du réactif ainsi formé vis-à-vis du facteur rhumatoïde dans des tests en tubes. La plus forte teneur en anticorps du réactif selon l'invention permet par conséquent de discriminer de façon très sélective le facteur rhumatoïde éventuellement présent des hétéro-anticorps, anti-hématies d'origine étrangère ou anticorps de FORSMAN présents dans les sérums humains.

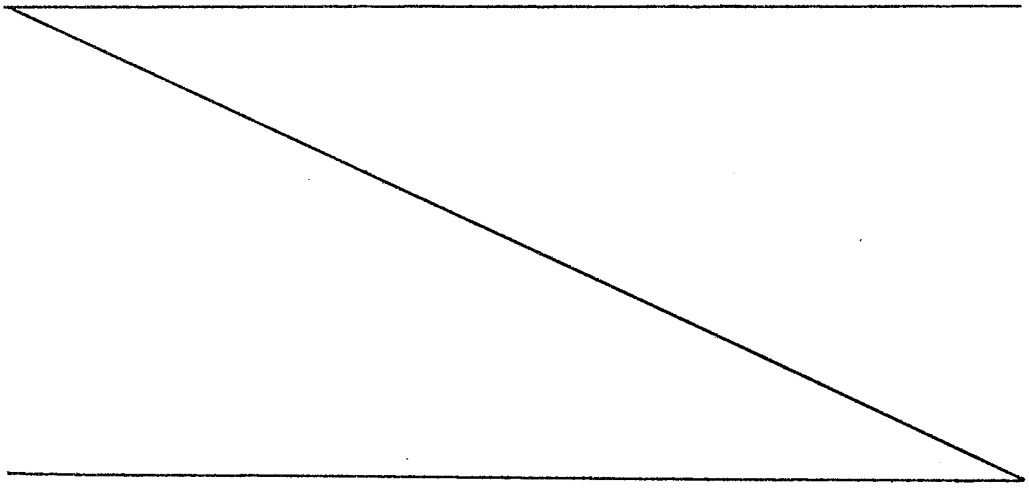
L'invention concerne donc également un procédé de détection du facteur rhumatoïde ou analogue, caractérisé par

la mise en présence du complexe tel que ci-dessus défini avec un sérum d'étude (ou autre échantillon biologique, en particulier liquide articulaire) dans des tubes ou analogues et par la détection ou non d'une hémagglutination dispersée selon que le sérum contient ou non le facteur rhumatoïde.

Le procédé de détection est avantageusement mis en oeuvre dans des conditions semblables à celles qui ont déjà été proposées dans le passé pour la détection en tubes ou microplaques des complexes hématies-anticorps préparés de façon extemporanée, le réactif et le sérum ou analogue à étudier étant éventuellement dilués au préalable, cependant sans qu'il soit nécessaire de réaliser une adsorption préalable de l'échantillon à tester en vue d'en éliminer les anticorps parasites.

La présence du facteur rhumatoïde dans le sérum d'un patient se traduit au contraire par une absence de sédimentation et plus particulièrement par la formation de tapis d'hématies sensibilisées après quelques heures de contact au sein d'une solution tampon, notamment à pH sensiblement neutre, du moins jusqu'à un degré ou seuil de dilution déterminé. Ce degré ou seuil fournit également une indication quantitative quant à la teneur en facteur rhumatoïde susceptible d'être présente dans le sérum étudié.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description non limitative qui suit de réactifs conformes à l'invention et de leurs modes d'élaboration.



1°) Choix des réactifs.

Le complexe selon l'invention peut être obtenu à partir de tout globule rouge et de tout sérum hémolytique sensibilisant, tel que ceux figurant au tableau ci-après :

Globules rouges	Sérums sensibilisants
A ou B	Iso immun-sérum anti A ou anti B
O Rh+ (CD)*	Sérum anti-Rh
Mouton	Lapin anti-mouton
Mouton	Lapin anti-chèvre
Chèvre	Lapin anti-chèvre
Chèvre	Lapin anti-mouton
Boeuf	Lapin anti-boeuf
Cobaye	Lapin anti-cobaye
Poule	Lapin anti-poule
Mouton	Cobaye anti-mouton
Mouton	Cheval anti-mouton
Souris	Lapin anti-souris
Cobaye	Lapin anti-cobaye
Mouton	Cobaye anti-mouton
Cheval	Cobaye anti-cheval
Boeuf	Cobaye anti-boeuf
Mouton	Iso immun-sérum de mouton
Mouton	Chèvre anti-mouton
Cynocéphale	Lapin anti-cynocéphale
Chat	Lapin anti-chat

* O Rh + (CD) : système rhésus se caractérisant par la présence, dans les globules rouges, des paires de gènes allélomorphes dénommés CD.

Le système globules rouges humains O Rhésus négatif - sérum de lapin anti-globules rouges humains s'avère particulièrement intéressant d'après les essais effectués sur ce complexe.

2°) Préparation des globules rouges.

Le sang de mouton est prélevé de façon stérile sur un agent anti-coagulant tel que l'acide éthylène-diamine tétraacétique (E.D.T.A.) (connu également sous le nom de "Complexon III") en solution à 1 g/l dans du sérum physiologique à 9 g/l. On peut également avoir recours à d'autres agents anti-coagulants comme par exemple le citrate de sodium.

Les globules fraîchement recueillis (9 volumes pour un volume d'E.D.T.A.) sont aussitôt lavés 4 fois au moyen de sérum physiologique (9g ClNa/litre). Si le liquide surnageant présente encore de l'hémolyse (ce qui peut être vérifié au colorimètre à 530 mμ) on effectue un ou plusieurs lavages supplémentaires.

Les globules rouges lavés peuvent alors être soit remis en suspension dans du sérum physiologique à 10%, en vue de sa mise en contact ultérieure avec l'immun-sérum ou encore, et de préférence, être au préalable soumis à un pré-traitement par le formol ou encore par un agent apte à fournir des tanins; notamment en opérant comme suit :

3°) Préparation des formules rouges formolés.

A un volume de globules rouges de mouton en suspension entre 5 et 15% dans du sérum physiologique (solution à 9g/l de ClNa) on ajoute un volume égal d'une solution de formol diluée entre 1 et 5 % dans du sérum physiologique (le formol appliqué étant un formol à 40 % préalablement neutralisé jusqu'à pH 7,2 au moyen d'une solution normale de soude).

On fait incuber la suspension sous agitation lente et constante à une température comprise entre 25 et 56°C pendant douze à vingt deux heures suivant les lots. On procède ensuite à 2 ou 3 lavages au moyen de sérum physiologique.

4 °) Préparation du sérum hémolytique de lapin anti-mouton.

Les globules rouges frais de mouton préparés de la façon décrite ci-dessus sont dilués au moyen de la moitié

de leur volume de sérum physiologique.

On injecte à un lapin 4 ou 5 fois, à une semaine d'intervalle, 3 ml de ces globules rouges par voie sous-cutanée puis on procède à deux injections par voie intra-veineuse.

Après vérification du titre du sérum, on prélève le sang de l'animal par ponction de la carotide, une semaine après la dernière injection.

Après coagulation du sang, on recueille le sérum que l'on chauffe à 56°C pour détruire le complément.

On conserve alors le sérum dans des ampoules stériles à +4°C.

5°) Ajustement du titre du sérum hémolytique

On utilise ce sérum hémolytique complet de lapin anti-mouton ou la fraction IgG qui est obtenue à partir de ce sérum par des procédés biochimiques connus.

Pour déterminer le titre hémagglutinant du sérum, on pratique une série de dilutions en progression géométrique du sérum hémolytique à étudier (ou de la fraction IgG) sous un volume de 50 µl de I/40ème) à 1/40000ème. On introduit une microgoutte de 16 à 25 µl d'hématies formolées (ou encore par exemple d'hématies formolées traitées au glutaraldéhyde ou d'hématies formolées traitées à l'acide tannique). La concentration des hématies se situe entre 0,5 et 2,5 % (volume du culot d'hématies mesuré vis-à-vis du tampon véhicule à V/V).

Le titre du sérum correspond à l'inverse de la dernière dilution présentant une absence de sédimentation des hématies. Au titre mesuré, par exemple 1/5000e, correspond 1 unité hémagglutinante. La sensibilisation décrite ci-après des hématies sera effectuée en excès d'anticorps de 2 à 20 unités hémagglutinantes, soit du 1/2500e au 1/250e selon la sensibilité souhaitée.

6°) Stabilisation du complexe immunologique formé par la combinaison d'hématies formolées et des anticorps anti-hématies de l'espèce correspondante.

La formolation des hématies telle que décrite dans le brevet et le certificat d'addition susdits, est insuffisante pour assurer la stabilité définitive du

complexe pendant une longue période, vis à vis de l'hémagglutination spontanée, compte tenu du grand excès d'anticorps utilisé.

La formolation à haute température 50 - 56°C permet d'améliorer la résistance des hématies. Mais pour assurer une stabilité de très longue durée il est indispensable selon l'invention de pratiquer un deuxième traitement par le formol ou par une autre substance aldéhydique tel que le glutaraldéhyde ou une substance telle que l'acide tannique, ayant des propriétés tannantes, en présence d'albumine ou d'une protéine ayant des propriétés équivalentes.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et nullement limitatif.

1er exemple :

Des globules rouges de mouton formolés, tels que ceux obtenus sous 3°) ci-dessus sont remis en suspension entre 5 et 10% dans du sérum de lapin anti-mouton ou la fraction IgG purifiée de ce sérum, lui-même dilué à une concentration de 5 à 20 unités hémagglutinantes en tampon phosphaté 7,2.

Le complexe globules rouges anticorps est alors traité par un volume de glutaraldéhyde à la concentration de 0,1 à 3 % ou de solution d'acide tannique à la concentration de 0,010 à 0,05 % en tampon phosphaté 7,2 contenant de 1 g à 10 g/l d'albumine bovine à une température au moins égale à 37°C et de préférence comprise entre environ 50°C et 56°C pendant un minimum d'une heure.

Le complexe stabilisé obtenu est lavé plusieurs fois en tampon phosphaté 7,2 contenant 3 g/l d'albumine bovine, puis finalement repris à la concentration de 0,5 à 2,5 % dans une solution de tampon phosphaté de pH 7,2 à 8,2 contenant de l'albumine bovine à la concentration de 1 à 10 g/l puis finalement repris dans une solution de tampon phosphaté de pH 7,2 à 8,2 contenant de l'albumine bovine à la concentration de 1 à 10 g/l. Les agents conservateurs utilisés peuvent être le merthiolate à 0,1 g/l, connu notamment sous la désignation Merseptyl ou l'azide de sodium à 1 g °/₀₀. D'autres agents conservateurs pourront également être utilisés.

Une suspension d'hématies témoins non sensibilisées sera ajustée dans les mêmes conditions de 0,5 à 2,5 % dans une solution de tampon phosphaté de pH 7,2 à 8,2.

2ème exemple.

Les globules rouges formolés tels qu'obtenus sous 3° sont remis en suspension 5 et 10 % dans un tampon phosphaté de pH 7,2. Cette suspension est traitée avec un volume soit d'une solution de glutaraldéhyde à la concentration de 0,1 à 3% en tampon phosphaté de pH 7,2 pendant au moins une 1/2 heure, soit d'une solution d'acide tannique de 0,010 à 0,05% dans le même tampon phosphaté 7,2 pendant au moins une 1/2 heure, à la température de 37° C. On procède ensuite à plusieurs lavages en tampon phosphaté.

Les hématies ainsi traitées sont remises en suspension entre 5 et 10 % dans du sérum de lapin anti-mouton ou la fraction IgG purifiée de ce sérum lui-même dilué à une concentration de 2 à 5 unités hémagglutinantes en tampon phosphaté 7,2 contenant de 1 à 10 g. d'albumine bovine par litre.

L'ensemble est chauffé sous agitation continue pendant au moins une 1/2 heure entre 50 et 56°C.

On procède à plusieurs lavages en tampon phosphaté 7,2.

Le complexe immunologique ainsi stabilisé sera finalement remis en suspension à la concentration de 0,5 à 2,5 % dans une solution de tampon phosphaté de pH 7,2 à 8,2 contenant de l'albumine bovine à la concentration de 1 à 10 g/l, ou dans une solution de sérum de lapin normal à la concentration de 1 à 10 % (V/V) ou dans une solution de Merseptyl à 0,1 g ‰ ou d'azide de sodium à 1 g °/₀₀.

DESCRIPTION DE LA NOUVELLE TECHNIQUE D'HEMAGGLUTINATION DIRECTE EN microplaques pour le titrage du "Facteur Rhumatoïde".

Avec le réactif stabilisé selon l'invention il est possible de réaliser une nouvelle méthode de titrage du facteur rhumatoïde par exemple en microplaques de type connu sous la désignation commerciale "Microtiter System".

Les caractéristiques et les avantages du nouveau procédé de titrage ressortiront plus clairement de la description qui va suivre :

On utilise des microplaques en matière plastique munies d'alvéoles cylindriques dans leur partie supérieure et dont le fond est conique (en V). On peut également

utiliser des plaques munies d'alvéoles dont le fond est en forme de U ou encore des tubes de verre ou en matière plastique dont le fond est en U.

Pour les dilutions du sérum on utilise une solution de tampon de pH 6 à 8,2 ; on peut utiliser tous les types de tampon connus, tampon phosphaté, tampon tris, tampon glycocolle, avec ou sans adjonction d'albumine, etc. Le tampon phosphaté de pH 7,2 est particulièrement bien adapté.

On peut alors procédér comme suit.

1°) On effectue une dilution mère au 1/20ème du sérum à examiner. On place 50 µl du sérum dans un tube de Kahn à usage unique et on ajoute 950 µl de solution tampon.

2°) On distribue à l'aide d'une micropipette 50 µl de solution tampon dans les 12 alvéoles d'une rangée d'une plaque "microtiter system". On place 50 µl de la dilution mère du sérum dans la 1ère alvéole, on mélange avec le tampon et on transfère 50 µl de la 1ère alvéole dans la 2ème, puis après mélange de la 2ème dans la 3ème et ainsi de suite jusqu'à la 11ème . On rejette enfin 50 µl de la 11ème. On obtient ainsi par les dilutions suivantes :

1ère	2e	3e	4e	5e	6e	7e	8e	9e	10e	11 e
1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960

On introduit dans la 12e alvéole 50 µl de la dilution mère du sérum au 1/20e. On mélange avec le tampon et on rejette 50 µl. Cette dilution au 1/40e est additionnée d'une microgoutte (1/60e ml) d'un réactif d'"hématies témoins" (hématies ayant subi les mêmes traitements que celles contenues dans le réactif témoin, à l'exception de la sensibilisation par l'immun-sérum anti-hématies). Le mélange obtenu constitue le témoin sérum. On dépose une microgoutte (1/60e ml) du réactif hématies sensibilisées stabilisées dans les 11 alvéoles.

On agite la plaque afin d'assurer une bonne homogénéisation puis on laisse la plaque immobile à température ambiante à l'abri des vibrations pendant toute la durée du test.

On effectue la lecture environ 2 heures après.

Interprétation des résultats :

Réaction positive : absence de sédimentation des hématies.

Réaction négative : bouton punctiforme d'hématies sédimentées.

Le titre du sérum en facteur rhumatoïde correspond à la plus forte dilution du sérum pour laquelle on observe une absence de sédimentation des hématies. La stabilité prolongée du complexe immunologique capable de révéler le "facteur rhumatoïde" au moins 2 ans à + 4°C a permis de réaliser un préétalonnage de ce réactif, selon la méthode décrite ci-dessus pour tester les sérums humains, par rapport au sérum standard international de polyarthrite rhumatoïde de l'OMS défini dans Bull. Who (S. G. ANDERSON, MW Bentzon, V. Houba P. KRAG : International reference preparation of rheumatoïd arthritis serum, Bull. Who 42 : 311, 1970).

L'étalon international en poudre de 17,1 mg qui correspond à 100 UI est repris dans 4 ml de solution tampon phosphaté de pH 7,2 soit une concentration de 25 UI/ml. La solution est ensuite répartie dans une série de tube qui seront conservés au congélateur à -20°C.

On réalise sous un volume de 50 microlitres comme pour les sérums étudiés une série de dilutions de l'étalon en microplaques à partir de 1/8e, 1/16e, 1/32e, 1/64e, 1/128e, 1/256e, 1/512e, 1/1 024e, 1/2 048e, en tampon phosphaté 7,2. On introduit dans chaque alvéole une microgoutte (1/60e ml) du réactif hématies sensibilisées dont le titre est à déterminer. Le seuil de sensibilité limite correspond à la plus forte dilution de l'étalon présentant une hémagglutination des hématies. Par exemple, si la dilution est 1/256e, le titre de la préparation d'hématies sensibilisées sera de 25 : 256 = 0,1 UI/ml, ce qui correspond pour un sérum dont la première dilution étudiée est de 1/40e à une sensibilité de 4 UI/ml. Ainsi le titre du sérum en facteur rhumatoïde peut être exprimé directement en UI/ml.

Ainsi, par exemple, une réaction positive limite au 1/1 280e correspond-elle, lorsqu'on opère une série de dilutions avec un lot de réactifs stabilisés dont le seuil de sensibilité est de 0,1 à 128 UI/ml ; comme il résulte du tableau suivant, dans lequel les rapports indiqués représentent des dilutions et les nombres

indiqués en UI/ml représentent chacun des concentrations correspondantes de facteur rhumatoïde, qui seraient décelées dans la mesure où la dilution correspondante serait représentative d'une "réaction positive limite".

	UI/ml		UI/ml
1/40e.....	4	1/1 280e.....	128
1/80e.....	8	1/2 560e.....	256
1/160e.....	16	1/5 120e.....	512
1/320e.....	32	1/10 240e....	1 024
1/640e.....	64	1/20 480e....	2 048
		1/40 960e....	4 096

REVENDICATIONS

1. Complexe stabilisé formé à partir d'antigènes globulaires, notamment d'hématies, d'une part, et d'anticorps solubles à l'égard de ces antigènes globulaires, tels qu'ils sont susceptibles d'être fournis par un immunsérum préparé au préalable à l'égard desdits antigènes globulaires, d'autre part, ce complexe étant approprié pour la détection du facteur rhumatoïde dans des essais en tubes ou microplaques, caractérisé en ce qu'il contient une quantité relative d'anticorps conférant à ce complexe un seuil de sensibilité par rapport au sérum standard international de polyarthrite rhumatoïde de l'OMS se situant entre environ 0,01 et 1 UI/ml, notamment entre environ 0,05 et 0,30 UI/ml, ce qui correspond comme seuil de détection du facteur rhumatoïde dans un sérum dilué au 40ème respectivement aux intervalles d'environ 0,4 à 40 UI/ml et d'environ 2 à 12 UI/ml, et en ce qu'il est stabilisé au point de ne pas donner lieu à une hémagglutination spontanée en l'absence de ce facteur rhumatoïde, notamment en présence d'un sérum exempt de facteur rhumatoïde.

2. Complexe stabilisé formé à partir d'antigènes globulaires, notamment d'hématies, d'une part, et d'anticorps solubles à l'égard de ces antigènes globulaires, tels qu'ils sont susceptibles d'être fournis par un immunsérum préparé au préalable à l'égard desdits antigènes globulaires, d'autre part, ce complexe étant approprié pour la détection du facteur rhumatoïde dans des essais en tubes ou microplaques, caractérisé en ce que la teneur relative en anticorps qu'il retient par rapport à la teneur relative maximum qui peut être fixée sur des antigènes globulaires analogues se situe entre environ 2 et environ 20, de préférence environ 3 et environ 10 unités hémagglutinantes.

3. Procédé de préparation de complexe stabilisé selon les revendications 1 à 2, caractérisé en ce que les antigènes globulaires retenus et qui serviront de support pour les anticorps provenant d'immunsérums correspondants font l'objet :

- d'au moins deux traitements successifs avec deux agents respectivement distincts du type aldéhyde ou agent tannant du type de ceux qui sont capables de former avec l'hémoglobine des hématies une combinaison entraînant une transformation chimique de l'hémoglobine, notamment sous forme d'un composé brunâtre, le premier et, éventuellement même le second de ces traitements étant effectués avant la mise en contact

de ces antigènes globulaires avec les anticorps destinés à être retenus sur ceux-ci et,

- un traitement par au moins une substance notamment de type protidique telle que l'albumine ayant des propriétés *dispersives*, c'est-à-dire permettant à cette substance d'entrer en compétition avec les anticorps sensibilisants :

  - en se fixant sur la membrane du globule rouge ;

  - ou en se combinant avec les anticorps dans le cas où le complexe immunologique globules rouges (ayant subi un traitement avec un agent du type aldéhyde ou avec un agent tannant)-anticorps est traité par un agent du type aldéhyde ou par un agent tannant en présence d'albumine.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le traitement avec la substance telle que l'albumine peut être réalisé simultanément avec le traitement final par le premier type d'agent sus-mentionné -ou tout traitement avec un tel agent en sus des deux traitements minima selon la revendication 3- à titre de traitement final.

5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le traitement peut être réalisé séparément du traitement avec le premier type d'agent sus-mentionné -ou tout traitement avec un tel agent en sus des deux traitements minima selon la revendication 3- à titre de traitement final.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5 caractérisé en ce que les agents du type aldéhyde sont choisis parmi l'aldéhyde formique, le glutaraldéhyde, l'aldéhyde pyruvique ou aldéhyde analogue, l'agent préféré étant le glutaraldéhyde.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'agent du type aldéhyde est le glutaraldéhyde.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que l'agent tannant est choisi parmi l'acide tannique, les tanins végétaux et synthétiques, la para benzoquinone, l'acide sulfosalicylique, les substances tannantes d'origine minérale telles que sels de chrome, chlorure de chrome, zirconium, silicate de soude, hyposulfite de soude.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisé en ce que le deuxième type de substance

est constitué par l'albumine notamment l'albumine bovine, par d'autres substances de même nature albuminoïde en particulier le sérum d'autres espèces animales ou par du sérum humain ou des fractions albumines α et β globulines isolées de ces sérums ou par l'une quelconque des protéines du lait ou par l'un quelconque de leur mélange.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 9, caractérisé en ce que la substance ayant des propriétés dispersives est choisie parmi le polyvinyle pyrrolidone, les émulsifiants de type anionique, cationique ou non ionique.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 10, caractérisé en ce que le traitement avec la substance électronégative et dispersante est effectué à une température supérieure à 37°C, de préférence entre 50 et 60°C à un pH compris entre environ 7 et environ 8,5.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 11, caractérisé en ce que les traitements avec les aldéhydes ou agents tannants, de préférence le dernier de ces traitements, sont effectués dans les conditions de température et de pH définies selon la revendication 11.

13. Procédé de détection du facteur rhumatoïde ou analogue, caractérisé par la mise en présence du complexe tel que défini selon les revendications 1 et 2, avec un sérum d'étude (ou autre échantillon biologique, en particulier liquide articulaire) dans des tubes ou analogues et par la détection ou non d'une hémagglutination dispersée selon que le sérum contient ou non le facteur rhumatoïde.

14. Procédé de détection selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre dans des conditions semblables à celles qui ont déjà été proposées dans le passé pour la détection en tubes ou microplaques des complexes hématies-anticorps préparés de façon extemporanée, le réactif et le sérum ou analogue à étudier étant éventuellement dilués au préalable, cependant sans qu'il soit nécessaire de réaliser une adsorption préalable de l'échantillon à tester en vue d'en éliminer les anticorps parasites.

15. Procédé de détection selon les revendications 13 et 14, caractérisé en ce que la présence du facteur rhumatoïde dans le sérum d'un patient se traduit par une absence de sédimentation et plus particulièrement par la formation de tapis d'hématies sensibilisées après quelques heures de contact au sein d'une solution tampon, notamment à pH sensiblement neutre, du moins jusqu'à un degré ou seuil de dilution déterminé.