

Etude quantitative d'anticorps humains anti-insulines animales par la méthode Radio-Immunologique de Berson et Yalow

Comportement des antisérums vis à vis d'insulines bovine, porcine et humaine

Par

G. ROSSELIN, G. TCHOBROUTSKY, R. ASSAN, J. LELLOUCH, J. DOLAIS et M. DEROT

Collaboration technique de Mr. J. DROUET et de Mlles N. GRENIER et A.M. GRAPIN

Laboratoire de Radio-Immunologie de la Chaire de Clinique du Diabète et des Maladies de la Nutrition (Pr. M. DEROT), Paris, Groupe de Recherche de Diabétologie de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm).

Reçu le 13 avril 1965

Summary. Insulin antibodies were studied quantitatively by the radio-immunological method of BERSON and YALOW in 14 diabetics.

The antibodies have at least two types of reactive sites, each of them being defined by their capacity and their equilibrium constant on which the free standard energy change of the insulin antibody reaction depends.

The equilibrium constant and the capacity of the first type of reactive sites must be sufficiently high to ensure the immune origin of resistance to insulin.

Usually immune serum has less affinity for porcine than for beef insulin and is less able to distinguish between human and porcine insulin.

However, because of the individual variations in immune response of human subjects treated by the same insulin it is impossible to see, for one serum, from the graph of direct reaction at equilibrium what will occur with the cross reaction. Quick tests for association and equilibrium studies are useful to analyse series of sera and to detect clinical consequences of antibodies to insulin.

Résumé. L'étude quantitative des anticorps anti-insulines chez l'homme a été effectuée chez 14 malades diabétiques par la méthode radio-immunologique de BERSON et YALOW.

Les antisérums possèdent au moins deux types de sites réactifs.

Dans l'interprétation des insulino-résistances immunes, le premier type de sites réactifs intervient de façon prépondérante pour lier l'insuline.

La plupart des antisérums différencient l'insuline de

boeuf de l'insuline de porc mais les comportements envers l'insuline porcine et humaine sont souvent analogues.

Cependant les caractéristiques de l'antisérum peuvent être très différentes chez des diabétiques ayant été traités par la même insuline.

Zusammenfassung. Mit der radioimmunologischen Methode von BERSON and YALOW wurden bei 14 Diabetikern quantitativ Insulinantikörper untersucht.

Die Antikörper haben mindestens 2 Typen von Reaktionsstellen, die jeweils durch ihre Bindungskapazität und ihre Gleichgewichtskonstante definiert sind, von der die Änderung der freien Standard-Energie der Insulin-Antikörper-Reaktion abhängt.

Die Gleichgewichtskonstante und die Bindungskapazität des ersten Reaktionsstellentyps müssen genügend hoch sein, um den immunologischen Ursprung einer Insulin-Resistenz annehmen zu können.

Im allgemeinen hat das Immuneserum weniger Affinität für Schweine- als für Rinderinsulin, doch besteht oft kein Unterschied zwischen der Affinität für Schweine- und menschliches Insulin.

Wegen der individuellen Schwankungen der immunologischen Reaktion bei Personen, die mit dem gleichen Insulin behandelt wurden, ist es jedoch unmöglich, aus der Kurve der direkten Reaktion bei Gleichgewicht für ein Serum abzulesen, wie die Kreuzreaktion verlaufen wird. Schnellteste für Bindungs- und Gleichgewichtsuntersuchungen sind für die Reihenanalyse von Serum und für die Feststellung sich aus der Antigenantikörperreaktion ergebender klinischer Konsequenzen von Nutzen.

L'emploi d'insulines marquées par l'Iode 131 a montré que presque tous les sujets recevant de l'insuline développent rapidement des anticorps anti-insuline²; les sérums des sujets n'en n'ayant jamais reçu ne lient pas l'insuline iodée^{2,13}. Les complexes insuline-anticorps humains anti-insulines animales sont habituellement solubles et peuvent être mis en évidence par rhéophorèse ou rhéo-electrophorèse sur papier ou par précipitation secondaire^{2,12}. La grande sensibilité de la méthode radio-immunologique de BERSON et YALOW permet l'étude quantitative de la réaction d'équilibre dynamique insuline + anticorps \rightleftharpoons complexes insuline anticorps.

L'analyse expérimentale de cette réaction^{3,12} indique que l'insuline est sans doute monovalente dans sa liaison avec les anticorps et que ceux-ci possèdent habituellement au moins deux types de sites réactifs. La comparaison des comportements d'un même antisérum humain envers des insulines de boeuf, de porc et d'homme, permet de vérifier la différence de leurs

propriétés immunologiques et peut apporter un nouveau paramètre dans l'analyse des insulino-résistances.

Matériel et Méthodes

1. Les sérums de 29 diabétiques traités par l'insuline depuis plus de 3 mois ont été étudiés à une ou plusieurs reprises. Le sang est prélevé sur tube sec et stérile le matin à jeun avant l'injection d'insuline; puis il est centrifugé après coagulation à la température du laboratoire. Les sérums sont conservés à +4°C et testés une à 8 semaines plus tard. Certains sérums additionnés de merthiolate au 1/10000^o ont été conservés à +4°C ou à -20°C et étudiés à nouveau 3 à 6 mois plus tard.

2. L'insuline iodée (Iode 131 S₃ de Saclay) a été préparée selon la méthode de HUNTER et GREENWOOD⁹ suivie de passage sur colonne de résine IRA 400¹¹ ou sur cellulose selon la technique de BERSON et YALOW⁵, à

partir d'insuline purifiée de boeuf, de porc et d'homme*, avec une activité spécifique inférieure à 250 microcuries par microgramme. L'insuline iodée est conservée à -20°C en flacons contenant environ 50 micro-unités par ml. Chaque flacon est dégelé et utilisé une seule fois.

3. Les standards d'insuline purifiée bovine, porcine ou humaine, sont préparés extemporanément à partir de solutions mères, en tampon véronal 0,05 ou 0,1 M, pH 8,6, 2,5‰ albumine humaine.

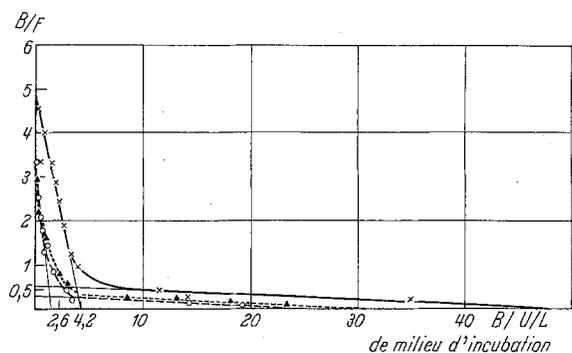
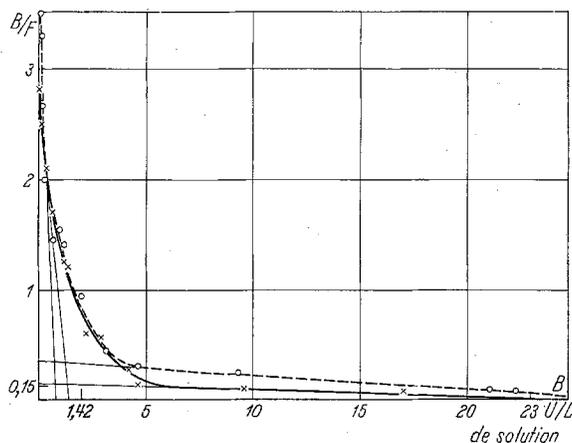


Fig. 1 et 2. Etude quantitative à anticorps constant et antigène variable

4. *Indice d'Association*: Le sérum à étudier à la dilution finale de 1/10e ($50\ \mu\text{l}$ dans $500\ \mu\text{l}$ de volume réactif en tampon véronal pH 8,6, 0,1 ou 0,05 M) est mis à incuber pendant 50 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$ avec $12,5\ \mu\text{U}$ d'insuline iodée; puis l'insuline demeurée libre (F) est séparée de l'insuline liée à l'anticorps (B) par rhéophorèse sur papier Whatman 3 MC. L'indice d'association est fourni par la valeur du rapport $\frac{B}{F}$ (activité liée sur

activité totale immunologiquement réactive^{12,13}. Il a été déterminé avec des insulines iodées de boeuf, et de porc, pour 29 sérums et pour 13 d'entre eux également avec de l'insuline humaine.

5. *Dosage des capacités de fixation et détermination des constantes d'équilibre*: L'antisérum à une dilution constante et adéquate est mis en présence de quantités croissantes d'insuline (standards) contenant une quantité constante et traceuse d'insuline iodée de même nature jusqu'à des concentrations d'antigène permettant d'approcher la saturation de l'anticorps. Toutes les dilutions sont pratiquées en tampon véronal; la concentration protéique finale variable selon la dilution du sérum est, pour un sérum donné, comprise entre 2,5 et 7‰. A l'équilibre, ce qui demande 4 à 5 jours à $+4^{\circ}\text{C}$, B est séparé de F soit par migration sur papier*, soit par précipitation du complexe à l'aide d'un sérum de lapin anti- γ -globulines humaines¹². Si on porte sur un graphique (fig. 1 et 2) le rapport $\frac{B}{F}$ en

ordonnée et en abscisse B (exprimé en unités ou en moles d'insuline liée à l'anticorps par litre de solution) la courbe obtenue permet de déterminer la capacité de fixation de chacun des deux types de sites réactifs d'anticorps et de calculer les constantes d'équilibre K1 et K2 des réactions insuline-anticorps, constantes liées à la variation d'énergie libre standard accompagnant la formation des complexes. L'étude théorique du modèle proposé par BERSON et YALOW³ a été détaillée par ailleurs¹². Il faut noter que les valeurs déterminées par cette méthode dépendent surtout des points situés près des axes, points qui sont les plus difficiles à établir expérimentalement avec précision. Les sérums de 14 sujets (tableau 1) ont été ainsi étudiés à une ou plusieurs reprises avec de l'insuline de boeuf, de porc, et pour 7 malades de l'insuline humaine. Ces sujets ont été sélectionnés sur les données du test de détection (indice d'association) pratiqué sur 100 sérums¹³.

Résultats et Commentaires

Ils sont présentés dans les deux tableaux.

1. *Comparaison des indices d'association*: L'indice d'association des antisérums est le plus souvent plus faible pour l'insuline porcine que pour l'insuline bovine mais parfois les indices sont identiques (Tableau 2 et Fig. 3). L'association avec l'insuline humaine est également plus faible mais il est difficile de distinguer le comportement des sérums pour l'insuline de porc et pour l'insuline humaine. La nature de l'insulinothérapie préalable ne permet pas de discrimination. Un seul sérum différencie nettement les trois insulines (Observation AUG. rapportée par ailleurs¹³).

2. *Comportement des antisérums envers l'insuline bovine* (tableau 2). Lorsque les dilutions utilisées sont

* Endopancrine: P: S 197 (21,8U/mg) — B: Z — 141 (26,7 U/mg)

Lilly: B: 795372 (25,6 U/mg) — P: 818194 (25,9 U/mg)
Novo: B: 24,8 UI/mg 05462 (22,7—27,2) p. 0,95 — H: 23,4 UI/mg (20,4 — 27 mg) p. 0,95 IO 1862 — P: 25 UI/mg S 8563. B = Boeuf, P = Porc, H = Homme.

Nous remercions pour leurs dons d'insulines purifiées les Docteurs BOUCHET et LAURENT (Novo-France), LECOQ (Endopancrine Organon), REHFELD (Lilly-France) et Mary Root (Lilly Research Laboratories, Indianapolis).

* Les conditions protéiques optima permettant une bonne séparation justifient parfois l'emploi d'un γ entraîneur protéique.

Tableau 1. *Faits cliniques avant le prélèvement des sérums*

Données cliniques concernant les 14 malades pour lesquels on a déterminé les capacités de fixation en insulines des antisérums et les constantes d'équilibre des réactions insuline + anticorps \rightleftharpoons complexe insuline - anticorps
 Dans la colonne «ancienneté du diabète», les indications 1), 2), 3), signifient que plusieurs prélèvements ont été étudiés chez le même sujet à quelques mois de distance

Sulf = sulfamides antidiabétiques. Big = biguanides

Obs.	Poids Kg	Taille cms	Age sexe	Ancienneté du Diabète	Nature (Mixte = Boeuf + Porc)	Insulinothérapie Doses quot.	Durée	Qualité du Contrôle	Manifestations vasculaires spécifiques
1 CAD	50	166	47 ♂	8 ans pan- créatite	Boeuf	40	8 ans	bon	0
2 OLI	60	175	39 ♂	23 ans	Boeuf Boeuf Mixte	20 × 3 40 30	3 ans 15 „ 5 „	bon	Oeil Rein
3 COU	?	?	41 ♂	4 ans PCE	Boeuf Boeuf	20 à 60 150	3 ans 3 semai- nes.	mauvais „	?
4 AZI	68	158	47 ♀	7 ans	Boeuf 0 Mixte	20 à 40 Sulf. 25	4 ans 1 „ 2 „	bon	0
5 TOL	43	157	63 ♂	1 an	0 Boeuf Mixte	Sulf. 30 45-60	6 mois 6 „ 3 sem.	médiocre „ correct	0
6 DUM	43	168	24 ♀	11 ans PCE	Boeuf Boeuf Boeuf Boeuf	15 × 3 50 50 × 3 80-120	2 ans 3 „ 2 „ 4 „	mauvais	Oeil
7 DIS	63	160	60 ♀	15 ans	Boeuf Boeuf Mixte	20 60 55	3 ans 12 „ 1 sem.	mauvais	Oeil
8 SID	50	160	60 ♂	1) 10 ans 2) 11 „	Boeuf Mixte	discontin 100 40-50	1 mois 1 mois 1 an	mauvais „	0
9 LIV	52	156	32 ♀	6 ans	0 Boeuf Boeuf Porc	Sulf. 20 × 3 65 85	4 mois 1 an 1 „ 4 „	moyen	0
10 LAM	72	172	33 ♂	1) 2 ans 2) 2,5 „	Boeuf Boeuf Porc	20-40 80 × 3 40	2 ans 2 mois 6 mois	mauvais „ bon	0
11 CES	59	166	70 ♀	4 ans	0 Boeuf	Sulf. 40-70	3 ans 1 „	bon	0
12 FLO	70	155	55 ♀	12 ans	0 Boeuf 0 Boeuf 0	discontin 0 30 × 3 Sulf. 80-150 0	3 ans 2 „ 6 „ 1 „ actuel	mauvais	0
13 CLE	58	158	60 ♀	9 ans	Boeuf 0 Mixte	discontin 40 Sulf. + Big. 40-50	1 an 7 ans 1 an	bon	0
14 LEV	52	160	67 ♀	1) 3 mois 2) 6 „ 3) 12 „ K. Pancréas décédé	0 Boeuf Boeuf Porc Porc rapide	Sulf. 30 → 400 1000 100 à 200 < 100	1 mois 2 „ 1 sem. 6 mois	mauvais très mauvais médiocre „	0

Tableau 2. *Etude des antisérums*

Données quantitatives concernant les capacités de fixation totale (B^t) et du premier type de sites réactifs (B1) ainsi que les constantes d'équilibre K1 (premier type de sites réactifs) et K2 (second type de sites réactifs)

1. Les capacités de fixation sont exprimées en unités d'insuline par litre de sérum non dilué.

2. Les constantes d'équilibre (à $+4^\circ\text{C}$) sont exprimées en litres/Mole. Pour les calculs, on a retenu 6000 pour le poids moléculaire de l'insuline et 25 U par mg.

3. Les indices d'association pour l'insuline de boeuf (B), de porc (P) et d'homme (H) expriment le pourcentage d'insuline iodée traceuse liée en 50' à $+4^\circ\text{C}$ (voir texte).

Obs.	<i>Boeuf</i>		<i>Porc</i>		<i>Homme</i>		Indices d'Associa- tion 3
	Capacité de Fixation 1	K 2	Capacité de Fixation 1	K 2	Capacité de Fixation 1	K 2	
1 CAD	B1 3 Bt 12	K1 $180 \cdot 10^7$ K2 $6 \cdot 10^7$					
2 OLI	B1 <2 Bt 25	K1 $115 \cdot 10^7$ K2 $1 \cdot 10^7$	B1 <2 Bt 25	K1 $140 \cdot 10^7$ K2 $2,7 \cdot 10^7$	B1 <2 BT 24	K1 $280 \cdot 10^7$ K2 $1,6 \cdot 10^7$	B 22 P 22
3 COU	Bt 25		Bt 48				B 40 P 32 H 30
4 AZI			Bt 7				B 48 P 20 H 18
5 TOL	B1 27 Bt 85	K1 $89 \cdot 10^7$ K2 $17,5 \cdot 10^7$	B1 30 Bt 96	K1 $25 \cdot 10^7$ K2 $2 \cdot 10^7$	B1 24 BT 130	K1 $44 \cdot 10^7$ K2 $1,9 \cdot 10^7$	B 60
6 DUM	Bt 120		Bt 110		Bt 70		B 43 P 46 H 42
7 DIS	Bt 120		Bt 100				B 43 P 28 H 23
8 1) SID 2)	Bt 120 Bt 4	K2 $7,7 \cdot 10^7$	B1 40 Bt <2 Bt 4	K1 $5,7 \cdot 10^7$ K1 $140 \cdot 10^7$ K2 $8,6 \cdot 10^7$			B 80 P 45 H 36 B 54 P 20
9 LIV	B1 20 Bt 185	K1 $23,6 \cdot 10^7$ K2 $0,18 \cdot 10^7$	B1 23 Bt 150	K1 $18 \cdot 10^7$ K2 $0,26 \cdot 10^7$	B1 26 BT 195	K1 $12,4 \cdot 10^7$ K2 $0,23 \cdot 10^7$	B 49 P 26
10 1) LAM 2)	Bt 200 B1 <2 Bt 60	K1 $69 \cdot 10^7$ K2 $0,2 \cdot 10^5$	B1 6 Bt 42	K1 $15 \cdot 10^7$ K2 $0,06 \cdot 10^7$			B 50 P 26 H 31 B 40 P 40
11 CES	B1 15 Bt 240	K1 $30 \cdot 10^7$ K2 $0,1 \cdot 10^7$	B1 10 Bt 260	K1 $53 \cdot 10^7$ K2 $0,2 \cdot 10^7$			B 33 P 28
12 FLO	B1 20 Bt 275	K1 $18 \cdot 10^7$ K2 $0,4 \cdot 10^7$	Bt 175		Bt 160		P 66 B 70 H 48
13 CLE	B1 40 Bt 450	K1 $17 \cdot 10^7$ K2 $0,16 \cdot 10^7$	B1 17,5 Bt 250	K1 $20 \cdot 10^7$ K2 $0,15 \cdot 10^7$	B1 12 BT 300	K1 $37,5 \cdot 10^7$ K2 $0,12 \cdot 10^7$	B 52 P 37
14 1) LEV 2)	Bt 750 Bt 750		Bt 700 Bt 600		Bt 600 Bt 480		B 70 P 65 H 40 B 70 P 50 H 50
3)	B1 82 Bt 750	K1 $110 \cdot 10^7$ K2 $1,7 \cdot 10^7$					B 69 P 65

judicieuses on constate que les antisérums possèdent au moins deux sites de types réactifs (Fig. 1, 2). La capacité totale de fixation pour l'insuline de boeuf est comprise entre 4 et 750 U/l. Chez deux sujets, des variations importantes ont pu être observées dans le temps (Obs. 8 et 10). Dans le 3ème cas étudié (Obs. 14) on note une constance remarquable de la concentration en anticorps.

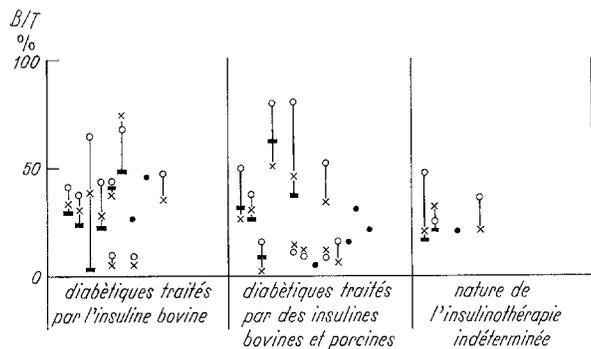


Fig. 3. Indices d'association des antisérums avec les insulines bovine, porcine et humaine. Les cercles noirs indiquent des valeurs identiques pour l'insuline de boeuf et de porc

La détermination graphique de la capacité de fixation (approchée) du premier type de sites réactifs (B_1) montre que celui-ci est peu abondant par rapport à la capacité totale. Les constantes d'équilibre K_1 et K_2 (à $+4^\circ\text{C}$) sont très différentes. Le plus souvent K_1 est 100 fois plus élevé que K_2 , parfois des centaines de fois supérieur (Obs. 10/2e). Habituellement la constante d'équilibre est d'autant plus élevée que la concentration de l'anticorps est plus faible en accord avec les résultats de BERSON et YALOW³.

3. *Insuline porcine* (tableau 2) : la capacité totale de fixation des antisérums pour l'insuline de porc est pratiquement identique (11 fois sur 13 sérums) à la capacité de fixation pour l'insuline de boeuf, même chez des diabétiques n'ayant jamais reçu d'insuline de porc avant le prélèvement du sérum. (Obs. n° 3, 6, 7, 11, 14 — 1er P). La constante d'équilibre K_1 est pour certains sérums plus faible pour l'insuline de porc que pour l'insuline bovine (Obs. 10/2e P et 5) mais le plus souvent (4 fois sur 6) les constantes sont peu différentes. Le rapport $\frac{B}{F}$ quand B tend vers 0, peut être par contre

plus faible pour l'insuline de porc que pour l'insuline de boeuf (fig. 2) puisqu'il dépend approximativement de la somme des produits de la constante d'équilibre multiplié par la concentration de chaque type de sites réactifs¹². L'intérêt thérapeutique de ces résultats a été discuté par ailleurs pour l'Obs. 10¹³.

4. *Insuline humaine* (Tableau 2) Des constatations analogues sont retrouvées dans l'étude de antisérums avec l'insuline humaine.

Discussion

1. La capacité totale (ou maximum) de fixation en insuline d'un antisérum est déterminée essentiellement

sur la liaison du second type de sites réactifs qui ne s'approche de la saturation que pour des concentrations très élevées d'insuline libre. Elle est, de plus, lente à atteindre l'équilibre. On conçoit que le second type de sites réactifs même important quantitativement peut ne jouer qu'un rôle modeste en clinique en particulier dans les besoins en insuline.

2. Le premier type de sites réactifs intervient d'une façon prépondérante pour lier l'insuline en fonction de son avidité et de sa concentration. Dans le plasma à $+37^\circ\text{C}$ la concentration d'insuline liée aux anticorps diminue mais la vitesse de réaction est plus rapide. L'appréciation de la constante d'association (k) du premier type de sites réactifs apparaît donc très importante dans l'étude des antisérums en particulier pour l'étude des réactions croisées^{3, 4, 14}. L'indice d'association qui reflète cette constante nous semble utile pour analyser et comparer les antisérums^{12, 13}.

Quand un sérum possède un anticorps abondant avec un premier type de sites réactifs de forte concentration et dont la constante d'équilibre avec l'insuline est élevée (Obs. 14, LEV . .), l'insulinorésistance est patente.

3. La différence de comportement vis à vis de l'insuline de boeuf et de porc est habituellement nette mais l'étude quantitative montre que ce comportement, pour un cas donné, ne dépend pas nécessairement de l'insuline injectée (Fig. 1 et 2; tableaux 1 et 2). Toutefois, l'affinité d'un anticorps est habituellement moindre pour des insulines hétérologues : en particulier, en étudiant la réaction antigène-anticorps par des méthodes d'inhibition compétitive, BERSON et YALOW^{4, 5, 14, 15} ont établi que la séquence des affinités décroissantes des sérums humains anti-insulines bovine et porcine est la suivante: boeuf = mouton > porc > cheval > bonite > thon > homme.

L'intérêt théorique de tels faits est important en particulier en ce qui concerne la comparaison des activités biologiques et immunologiques en fonction de la structure primaire in ¹. L'intérêt thérapeutique est indéniable ^{6, 8, in 13, 14, 15}.

4. La liaison d'un sérum humain anti-insulines animales avec l'insuline humaine exogène pose le problème de sa liaison avec l'insuline humaine endogène éventuellement présente dans le plasma. Une telle possibilité a été démontrée par GRODSKY⁷ mais il est vraisemblable que l'affinité est faible.

5. Les variations de la concentration sérique des anticorps chez un même malade, ainsi que la différence des réponses d'individus soumis aux mêmes conditions d'immunisation, restent à analyser^{6, 10, 13}.

Pour l'étude des grandes séries et la répétition des examens chez le même malade, l'analyse de l'indice d'association est d'un grand intérêt^{12, 13}. Nous utilisons également un indice de capacité appréciant à l'équilibre la quantité d'insuline liée par l'antisérum quand 0,25 mU d'insuline sont mis en présence de 10 ml de sérum.

- Bibliographie.** ¹ ASSAN, R., G. ROSSELIN, G. TCHOBROUTSKY et M. DEROT: Antigénicité de l'insuline. *Rev. franç. Et. clin. biol.* (sous presse). — ² BERSON, S. A., R. S. YALOW, A. BAUMAN, M. A. ROTHSCHILD et K. NEWERLY: Insulin I 131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest* **35**, 170—190 (1956). — ³ BERSON S. et YALOW R. S.: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. *J. Clin. Invest* **38**, 1996—2016 (1959); — ⁴ Species specificity of human anti-beef, pork, insulin serum. *J. Clin. Invest* **38**, 2017—2025 (1959); — ⁵ Preparation and purification of human insulin I 131; binding to human insulin binding antibodies. *J. Clin. Invest* **40**, 1803—1808 (1961). — ⁶ BOSHELL, B. R., J. C. BARRETT, A. S. WILENSKY et T. B. PATTON: Insulin résistance. Response to insulin from various animal sources, including human. *Diabetes* **13**, 144—152 (1964). — ⁷ GRODSKY G. M.: Induced auto-antibodies to insulin in man and rabbits. V^o Congrès Fed. Inter. Diab. Toronto — I volume *Excerpta Med.* n^o74, p. 171 (1964). — ⁸ — et P. H. FORSHAM: Comparative binding of beef and human insulin to insulin antibodies produced in man and guinea pigs. *J. Clin. Invest* **40**, 799—803 (1961). — ⁹ HUNTER, W. M. et F. C. GREENWOOD: Preparation of Iodine 131 labelled human growth hormon of high specific activity. *Nature* n^o 4827, 495—496 5 May 1962. — ¹⁰ PALUMBO, P. J., G. D. MOLNAR et W. N. TAUXE: Constancy of serum-protein binding of insulin in diabetics who have changing insulin needs. *Diabetes* **12**, 372 (1963). — ¹¹ ROSSELIN, G. et J. DROUET: Iodation de l'insuline par la chloramine T. Symposium Européen sur le Diabète Sucré, Genève 1963. Non publié. — ¹² ROSSELIN, G., G. TCHOBROUTSKY, R. ASSAN, J. LELLOUCH et M. DEROT: Etude radio-immunologique de la réaction insuline anticorps anti-insuline. *Rev. franç. Et. clin. biol.* (sous presse). — ¹³ TCHOBROUTSKY, G., R. ASSAN, G. ROSSELIN, J. DOLAIS et M. DEROT: Les anticorps anti-insuline chez l'homme — étude radio-immunologique. VI^o Journées Annuelles de Diabétologie de l'Hôtel-Dieu — I vol. Flammarion Med. Editeurs, Paris 1965. — ¹⁴ YALOW, R. S. et S. A. BERSON: Reaction of fish insulins with human insulin antiserum; potential value in the treatment of insulin resistance. *New Engl. J. Med.* **270**, 1171—1178 (1964). — ¹⁵ YALOW, R. S. et BERSON S. A.: Immunologic aspects of insulin. *Am. J. Med.* **31**, 882—891 (1961).

G. ROSSELIN

Laboratoire de Radio-Immunologie de la
Chaire de Clinique du Diabète et des Maladies de la Nutrition (P. M. Dérot)
Hôtel-Dieu
Paris IV^e/France