

**GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (total) RIA**  
**125 TUBES (Cat. N° GLP1T-36HK)**

## I. UTILISATION

Cette trousse RIA est destinée au dosage de toutes les formes du Glucagon-Like Peptide-1 [par exemple GLP-1 (7-36) amide, GLP-1 (7-37), GLP-1 (9-36) amide, GLP-1 (9-37), GLP-1 (1-36) amide et GLP-1 (1-37)] dans le plasma et dans d'autres milieux biologiques. La séquence du GLP-1 est fortement conservée d'une espèce à l'autre et est identique chez tous les mammifères. L'anticorps de cette trousse se lie spécifiquement au domaine C-terminal du GLP-1, sous ses formes amidées ou non. Les calibrateurs et le traceur sont préparés avec du GLP-1 (7-36) amide.

**Pour la recherche uniquement.**

## II. PRINCIPE DU DOSAGE

Dans un dosage radioimmunologique, une quantité fixe d'antigène marqué est incubée avec une dilution constante de l'antisérum calculée de telle sorte que le nombre de sites de liaison de l'antigène est limité, par exemple, seuls 50% de traceur seront liés à l'anticorps. Si de l'antigène non marqué est ajouté dans le milieu, il y a compétition entre le traceur marqué et l'antigène non marqué pour un nombre limité et constant de sites de liaison sur l'anticorps. En conséquence, la quantité de traceur lié à l'anticorps diminue quand la concentration de l'antigène non marqué augmente. On peut effectuer la mesure après avoir effectué la séparation de l'anticorps lié du traceur libre et après avoir compté la fraction libre, la fraction liée ou les deux.

On prépare une courbe standard à l'aide de quantités croissantes d'antigène non marqué et on calcule à partir de cette courbe la concentration des échantillons inconnus. On a ainsi les quatre conditions de base d'un dosage radioimmunologique : un antisérum spécifique de l'antigène à doser, l'antigène marqué par une substance radioactive, une méthode de séparation de l'antigène sous forme liée à l'antisérum, de l'antigène sous forme libre, et finalement l'instrument qui permet de compter la radioactivité.

## III. RÉACTIFS FOURNIS

Chaque trousse contient le matériel suffisant pour 125 tubes :

### 1. Réactif A – Tampon de dosage GLP-1

1 flacon contenant 25 ml de tampon PBS 0,05M, pH 6,8 avec des inhibiteurs de protéases, du Tween 20, de la BSA à 1% et de l'azote de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi.

### 2. Réactif B - Solution d'antisérum

1 flacon contenant 13 ml d'antisérum de lapin anti-GLP-1 dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

### 3. Réactif C - <sup>125</sup>I GLP-1

1 flacon contenant 13,5 ml après reconstitution d'une solution de GLP-1 (7-36) amide marquée à l'iode 125, purifiée par HPLC (activité spécifique 636 µCi/µg). Sous forme lyophilisée. Chaque flacon a une activité < 56 kBq (1,5 µCi).

Préparation : reconstituer en ajoutant 13,5 ml de tampon de dosage (A) le jour d'utilisation. Laisser reposer à température ambiante pendant 30 minutes en agitant doucement le flacon à intervalles réguliers. **Stocker le reste de traceur dilué à -20°C.**

### 4. Réactifs D – Standards GLP-1

7 flacons contenant chacun 1 ml de GLP-1 (7-36) amide dans du tampon de dosage aux concentrations suivantes : 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 pM. Prêts à l'emploi.

### **5. Réactifs E - Contrôles 1 et 2**

2 flacons contenant chacun 2 ml d'une solution de divers peptides dont le GLP-1 (7-36) amide en solution tampon. Prêts à l'emploi.

### **6. Réactif F - Réactif précipitant**

1 flacon contenant 130 ml d'anticorps de chèvre anti-lapin en solution dans du tampon phosphate 0,05 M, qui contient du PEG à 3%, du Triton X-100 à 0,05%, de l'EDTA à 0,025 M et de l'azoture de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi. **A utiliser à 4°C.**

### **7. Réactif G – Réactif co-précipitant**

1 flacon contenant 2 ml d'Ig G de lapin dans le tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

### **8. Réactif H – Solution de reconstitution des échantillons**

1 flacon de 30 ml contenant des inhibiteurs de protéases. Prêt à l'emploi. **A utiliser à 4°C.**

## **IV. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS**

Congeler tous les réactifs à réception et les recongeler après usage. Eviter les congélations/décongélations répétées (>5 fois). Se référer à la date d'expiration figurant sur l'étiquette pour connaître la date d'expiration pour une conservation à -20°C. Ne pas mélanger les réactifs qui proviennent de différentes trousse, sauf s'ils proviennent du même lot.

## **V. PRECAUTIONS D'UTILISATION**

### **A. Règles de base de radioprotection**

1. Le matériel radioactif de cette trousse doit être manipulé en respectant les règles de sécurité concernant l'emploi des radionucléides en source non scellées.
2. Toute manipulation de substances radioactives doit s'effectuer dans une zone contrôlée, conformément à la réglementation en vigueur.
3. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.
4. Ne pas manger, boire ou fumer en zone contrôlée.
5. Eviter tout contact direct avec les produits radioactif. Utiliser des blouses et des gants de protection.
6. Tout déchet radioactif solide ou liquide sera éliminé selon la réglementation en vigueur.
7. Dans le cas d'une contamination ou de perte de substance radioactive, observer les procédures établies.

### **B. Autres précautions**

**ATTENTION** : Tous les réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium en tant qu'agent conservateur à une concentration de 0,08%. Bien qu'il s'agisse d'une concentration très faible, il faut noter que l'azoture de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des tuyauteries pour former des composés explosifs. Lors de l'élimination des réactifs dans l'évier, faire couler un grand volume d'eau pour éviter la formation d'azotures métalliques. Eviter toute contamination de la peau et des muqueuses.

## VI. MATERIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm (**ne pas utiliser des tubes en polypropylène ou en polystyrène car le GLP-1 adhère à ce type de matériau**).
2. Pipettes de précision et pointes de 100 µl
3. Distributeur automatique : 10 µl, 100 µl et 1,0 ml
4. Papier absorbant
5. Vortex
6. Réfrigérateur
7. Centrifugeuse réfrigérée capable de développer 2000 à 3000 xg
8. Compteur à scintillations gamma
9. Evaporateur concentrateur (ex. Speed Vac ou un dispositif d'évaporation sous azote)
10. Tubes coniques 1,5 ml
11. Ethanol à 95%
12. Eau désionisée
13. Bain de glace
14. Microcentrifugeuse
15. Bouchons en caoutchouc percés avec une aiguille de gauge 18.

## VII. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Pour le plasma, récolter le sang dans des Vacutainer EDTA-Plasma placés dans un bain de glace. Centrifuger immédiatement à 1000 g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée ou maintenir dans la glace et centrifuger dans l'heure qui suit.

Il est préférable de prendre des précautions si on utilise l'héparine comme anticoagulant, car sa présence en excès provoque une augmentation des taux<sup>5</sup>. Il est préférable de *ne pas* utiliser plus de 10 UI d'héparine par ml de sang prélevé.

On conservera les échantillons à 4°C, si on doit les doser dans les **3 heures**. **Pour un stockage prolongé, il est indispensable de les stocker à -70°C**. Eviter les congélations/décongélations répétées (> 3 cycles). Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

## VIII. DOSAGE

Il est important de suivre ce protocole et d'être précis dans les étapes de pipetage.

### Extraction des échantillons

En raison des faibles taux circulants de GLP-1 dans le plasma, il faut utiliser un minimum de 600 µl de plasma par échantillon pour un dosage en duplicat.

Amener tous les réactifs d'extraction et du dosage (sauf l'éthanol) à 4 °C juste avant de les utiliser. Les échantillons doivent être décongelés de manière à ce que le plasma reste à 4 °C à tout moment de la procédure. Pendant l'extraction, les échantillons peuvent être stockés dans un bain de glace ou à 4 °C pour **un maximum de 3 heures**.

Il est conseillé d'extraire et de doser les échantillons en double. Si le volume d'échantillon disponible est très limité, une extraction en simple peut être envisagée mais n'est pas recommandée.

1. Numéroter les tubes coniques de 1,5 ml et les disposer dans un bain de glace. Ajouter 1,1 ml d'éthanol à 95% dans chaque tube.
2. Pipeter 300 µl de plasma dans chaque tube. Ne pas extraire un volume inférieur à 300 µl. Fermer les tubes hermétiquement. Mélanger par inversion et vortexer soigneusement immédiatement après l'adjonction du plasma.
3. Incuber les tubes dans le bain de glace pendant 30 minutes.
4. Mélanger par inversion puis centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 minutes dans une microcentrifugeuse.
5. Décanter les surnageants dans des tubes en verre 12x75 mm. Fermer les tubes avec un bouchon en caoutchouc dans lequel est inséré une aiguille de gauge 18.
6. Placer les tubes dans un Speed Vac pour les évaporer à sec. Evaporer les tubes pendant 2 heures à température moyenne (45 °C) puis pendant 6 heures à température ambiante pour un total de 8 heures. Vérifier que tous les tubes ont été évaporés à sec. Si tel n'est pas le cas retirer les tubes complètement secs et continuer à évaporer les autres tubes par périodes supplémentaires de 30 minutes jusqu'à évaporation complète. D'autres méthodes d'extraction du plasma telles que l'évaporation sous courant d'azote sans chauffage sont envisageables mais doivent être validées par l'utilisateur.
7. Réhydrater les échantillons avec 300 µl de solution de reconstitution des échantillons (réactif H) à **4 °C**. Incuber 30 minutes dans un bain de glace ou à 4 °C. Vortexer doucement jusqu'à dissolution complète de l'échantillon (remarque : la plupart des échantillons fourniront une solution légèrement trouble). Les échantillons sont maintenant prêts à être doser directement dans ces tubes.

### Mise en place du dosage

Il est indispensable d'utiliser des tubes en verre.

Se référer au schéma du dosage pour la disposition des tubes. Les échantillons de contrôle doivent être inclus dans chaque dosage avant les échantillons et en queue de dosage.

### Jour 1 :

1. Pipeter 400 µl de tampon de dosage dans les tubes 1 et 2 correspondant à l'activité totale et dans les tubes 3 et 4 correspondant à la liaison non spécifique (LNS). Pipeter 300 µl dans les tubes 5 et 6 correspondant au B<sub>0</sub> et 200 µl dans les tubes correspondant à la courbe d'étalonnage et les échantillons de contrôle (tubes 7 à 24).
2. Pipeter 100 µl de calibrateurs et de contrôles en double (tubes 7 à 24)).
3. Pipeter 300 µl d'échantillon en double à partir des tubes réhydratés.
4. Ajouter 100 µl d'anticorps anti-GLP-1 dans tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (1 et 2) et à la LNS (3 et 4).
5. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à 4 °C.

### Jour 2 :

6. Reconstituer le traceur avec 13,5 ml de tampon de dosage. Mélanger. Pipeter 100 µl de GLP-1 marqué à l'iode 125 dans tous les tubes. Congeler immédiatement la solution de traceur inutilisée.
7. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à 4 °C.

### Jour 3 :

8. Ajouter 10 µl de réactif co-précipitant à tous les tubes sauf ceux correspondant à l'activité totale (1-2).
9. Ajouter 1,0 ml de réactif précipitant **froid (4 °C)** à tous les tubes à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale.
10. Mélanger au vortex et laisser incuber 20 minutes à 4 °C.
11. Centrifuger à 4 °C tous les tubes, à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale pendant 20 minutes à 2000 - 3000 x g. Remarque: si on utilise une vitesse inférieure à 2000 x g, ou si on a observé des précipités de mauvaise qualité au cours des dosages précédents, on augmentera le temps de centrifugation afin d'obtenir des précipités de bonne qualité (par exemple 40 minutes).

Conversion des tr/min.en xg

$$xg = (1,12 \times 10^{-5}) (r) (tr/min.)^2$$

r = distance radiale en cm (depuis l'axe de rotation jusqu'au fond des tubes)

tr/min. = vitesse du rotor

12. Décanter immédiatement le surnageant de tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (tubes 1 et 2), laisser égoutter pendant au moins 15 à 60 secondes, et éponger l'excès de liquide au bord des tubes. Remarque: ne retourner les tubes qu'une seule fois. Les culots sont fragiles et pourraient glisser.
13. Compter tous les tubes dans un compteur à scintillations gamma pendant 1 minute. Calculer la concentration en GLP-1 des échantillons en utilisant une procédure de calcul automatique.

## Schéma de dosage du GLP-1

Préparation	Jour 1				Jour 2		Jour 3		
	Étape 1	Étapes 2 et 3	Étape 4	Étape 5	Étape 6	Étape 7	Étape 8	Étape 9	Étapes 10-12
Numéroter les tubes	Ajouter Tampon de dosage	Ajouter Standard/ Contrôle/ Echantillon	Ajouter anticorps	Vortexer, couvrir, et incuber 20-24 heures à 4°C	Ajouter traceur	Vortexer, couvrir, et incuber 22-24 heures à 4°C	Ajouter réactif co-précipitant	Ajouter réactif précipitant	Vortexer et incuber 20 minutes à 4°C. Centrifuger 20 min. à 4°C, décanter et compter
1,2	400 µl	-	-		100 µl		-	-	
3,4	400 µl	-	-		100 µl		10 µl	1,0 ml	
5,6	300 µl	-	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
7,8	200 µl	100 µl de 10 pM	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
9,10	200 µl	100 µl de 20 pM	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
11,12	200 µl	100 µl de 50 pM	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
13,14	200 µl	100 µl de 100 pM	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
15,16	200 µl	100 µl de 200 pM	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
17,18	200 µl	100 µl de 500 pM	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
19,20	200 µl	100 µl de 1000 pM	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
21,22	200 µl	100 µl de C1	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
23,24	200 µl	100 µl de C2	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
25-n	-	300 µl d'échantillon	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	

## IX. CALCUL DES RÉSULTATS

### A. Explication

Les calculs des taux de GLP-1 peuvent être faits automatiquement par la plupart des compteurs gamma qui possèdent des capacités de traitement des données ou par un traitement indépendant des données par un logiciel disponible dans le commerce. Choisir un système à 4 paramètres ou un log/logit pour le traitement mathématique des données (**Remarque:** s'assurer que la LNS est bien soustraite de la moyenne des cpm obtenus pour chaque duplicate à l'exception de l'activité totale, avant de finaliser les calculs).

### B. Calcul manuel

1. Calculer la moyenne des coups par minute (CPM) obtenus pour les tubes correspondant à l'AT (tubes 1 et 2), à la LNS (tubes 3 et 4), Maximum de liaison (tubes 5 et 6), calibrateurs, contrôles et échantillons.
2. Soustraire la moyenne des coups correspondant aux tubes LNS de la moyenne des coups obtenus pour les autres tubes, (à l'exception de AT), pour obtenir la moyenne des coups corrigée.
3. Calculer le pourcentage maximum de liaison en divisant les CPM corrigés correspondant au standard zéro ( $B_0$ ) par les CPM moyens correspondant à l'activité totale (AT). Ce pourcentage devrait être compris entre 35 et 50%.
4. Calculer le pourcentage de liaison ( $B/B_0 \times 100$ ) correspondant à chaque standard et à chaque échantillon, en divisant la moyenne des coups corrigés de chacun des standards et de chacun des échantillons par la moyenne corrigée des coups correspondant au maximum de liaison (standard zéro).
5. Reporter le pourcentage de  $B/B_0$  correspondant à chaque standard en ordonnée et le logarithme de la concentration de chacun des standards en abscisse.
6. Construire la courbe standard en joignant les points obtenus.

7. Calculer la molarité en pM de GLP-1 des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

**Remarque:** En raison du volume d'extraction (300 µl), une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de concentration, et les molarités obtenues seront divisées par 3. Si le volume d'extraction utilisé est différent il faudra utiliser un facteur de correction approprié.

## X. INTERPRÉTATION – CRITÈRES D'ACCEPTATION

1. Si l'un des 2 contrôles est en dehors des limites acceptables, soumettre les résultats au biologiste responsable.
2. Si les CV observés entre les duplicats d'un même échantillon sont supérieurs à 10%, il faudra redoser l'échantillon.
3. La limite de sensibilité du dosage du GLP-1 est égale à 3 pM (pour un échantillon de 300 µl).
4. La limite de linéarité du dosage du GLP-1 est de 333 pM (pour un échantillon de 300 µl). Tout résultat supérieur à 333 pM devra être redosé après dilution à l'aide du Tampon de dosage.

## XI. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

### A. Sensibilité

La plus petite quantité de GLP-1 total qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 3 pM quand on utilise un extrait de 300 µl.

### B. Caractéristiques de la courbe standard

Les paramètres suivants sont indiqués sous forme de moyenne  $\pm$  1 écart type.

$$ED_{80} = 15 \pm 3 \text{ pM}$$

$$ED_{50} = 61 \pm 10 \text{ pM}$$

$$ED_{20} = 241 \pm 24 \text{ pM}$$

### C. Spécificité

La spécificité permet de connaître la capacité du test à mesurer l'analyte de façon sélective en présence d'autres composants présents dans la matrice de l'échantillon.

GLP-1 (7-36) humain	100%
GLP-1 (9-36) humain	100%
GLP-1 (7-37) humain	100%*
GLP-2 humain	<0,01%*
Glucagon humain	0,2 %*
Exendine	<0,01%*

## D. Précision

### Variation Inter et Intra - essai :

Echantillon	Moyenne (pM)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	20	22	23
2	53	29	10
3	131	35	21
4	204	38	14

Les calculs des variations intra et inter essais ont été réalisés sur 4 plasmas humains contenant différentes concentrations de GLP-1. Ces plasmas ont été dosés de manière à obtenir 10 résultats exploitables dans 4 dosages.

## E. Test de surcharge

### Test de récupération sur les échantillons de contrôle

Echantillon	Concentration sans extraction (pM)	Concentration après extraction (pM)	Récupération %
Contrôle bas	42	34	82
Contrôle élevé	437	343	78

Concentration des échantillons de contrôle de la trousse avant et après extraction.

### Test de surcharge sur des plasmas humains

Des quantités variables de GLP-1 ont été ajoutées à 4 plasmas humains.

Echantillon	GLP-1 Total ajouté (pM)	GLP-1 Total mesuré (pM)	GLP-1 Total attendu (pM)	Récupération %
1	0	16	-	-
2	10	31	26	119
3	50	57	66	86
4	100	92	116	79
1	0	40	-	-
2	10	55	50	110
3	50	90	90	100
4	100	128	140	91
1	0	29	-	-
2	10	38	39	97
3	50	41	79	90
4	100	108	129	94

## F. Linéarité

### Effet de la dilution du plasma

Différents volumes de plasmas humains contenant des concentrations variables en GLP-1 ont été analysés. Les facteurs de concentration 3, 2 et 1 choisis représentent respectivement les volumes 300 $\mu$ l, 200 $\mu$ l et 100 $\mu$ l. Les résultats montrent que le dosage n'est pas linéaire et qu'il est donc impératif d'utiliser un volume de 300 $\mu$ l pour les dosages plasmatiques.

Echantillon	Volume	GLP-1 mesuré (pM)	Concentration finale (pM/ml)
1	300 $\mu$ l	104,3	34,8
	200 $\mu$ l	31,9	15,9
	100 $\mu$ l	2,8	2,8
2	300 $\mu$ l	167,2	55,7
	200 $\mu$ l	83,5	41,8
	100 $\mu$ l	17,1	17,1
3	300 $\mu$ l	47,8	15,9
	200 $\mu$ l	6,8	3,4
	100 $\mu$ l	Indétectable	-

### G. Exemple de résultats d'analyse

N° tube	Nom	CPM	CPM moyens	CPM corrigés	B/B <sub>0</sub> %	Résultats en pM
1	Activité totale	10809	11098			
2		11386				
3	LNS	314	297			
4		280				
5	B <sub>0</sub>	5592	5494	5197		
6		5396				
7	Calibrateur 10 pM	5106	5040	4743	91,2	
8		4975				
9	Calibrateur 20 pM	4697	4671	4374	84,2	
10		4644				
11	Calibrateur 50 pM	3445	3501	3204	61,7	
12		3557				
13	Calibrateur 100 pM	2677	2663	2366	45,5	
14		2649				
15	Calibrateur 200 pM	1816	1776	1479	28,5	
16		1736				
17	Calibrateur 500 pM	1251	1198	901	17,3	
18		1144				
19	Calibrateur 1000 pM	934	876	579	11,1	
20		818				
21	Contrôle1	3904	3801	3504	67,4	40,7
22		3697				
23	Contrôle2	1261	1238	941	18,1	434,2
24		1214				
25-n						

Les résultats présentés ici ne sont que des exemples, et ne peuvent en aucun cas être utilisés comme courbe standard.

## XII. CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent que des contrôles soient inclus dans chaque série de dosages afin d'en vérifier les performances. Deux échantillons de contrôle sont inclus dans la trousse dans ce but. Il est nécessaire de doser ces contrôles ainsi que d'autres propres au laboratoire de façon régulière, afin d'établir des valeurs moyennes et des fourchettes de valeurs acceptables. La reproductibilité des paramètres de la courbe standard et des valeurs des contrôles doit se situer dans un intervalle de valeurs défini par le laboratoire.

1. Quand les 2 contrôles sont dans la fourchette des  $\pm 2$  DS : Dosage OK
2. L'un des contrôles est en dehors de la fourchette :

Vérifier les points suivants :

- a) Erreur de calcul.
- b) Duplicates des calibrateurs et des contrôles
- c) Vérification des solutions de réactifs
- d) Vérification du compteur gamma

## XIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsos S, Hebener JF. „Insulinotropic Action of Glucagon-Like peptide-1 (7-37) in Diabetic and Nondiabetic Subjects.“ *Diabetes Care* 15 :270-276, 1992
2. Morgan, C.R. and Lazarow, A. Immunoassay of Insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels in normal, subdiabetic, and diabetic rats. *Diabetes* 12:115-126, 1963.
3. Feldman H. and Rodbard D. « Mathematical Theory of Radioimmunoassay», in W.D. Odell and Doughaday, W.H. (Ed), Principles of Competitive Protein-Binding Assays. Philadelphia : J.B : Leppincott Company ; pp 158-203, 1971.
4. Westgard, J.O., et al. A multi-rule Shewart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27 :493-501, 1981.
5. Thorell J.I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31:187, 1973.

Fabriqué par :  
Millipore  
6 Research Park Drive  
St Charles, Missouri  
63304 USA

Distribué en France par :  
Labodia France  
266 avenue Daumesnil  
75012 Paris