

Fig. 1. X-ray photograph of *Sepia* sperm at 98% humidity. Long axis of sperm heads horizontal.

Received November 27th, 1952

## MÉTHODE PERMETTANT L'ÉTUDE CONJUGUÉE DES PROPRIÉTÉS ÉLECTROPHORÉTIQUES ET IMMUNOCHIMIQUES D'UN MÉLANGE DE PROTÉINES. APPLICATION AU SÉRUM SANGUIN

par

P. GRABAR ET C. A. WILLIAMS

*Service de Chimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)*

Bien que l'électrophorèse soit une des méthodes les plus douces pour analyser un mélange de protéines, il n'est pas exclu qu'elle entraîne des altérations ou des dissociations des constituants naturels. Les méthodes immunochimiques au contraire ne font pas courir ce risque. Leur plus grande sensibilité, d'autre part, permet d'affirmer avec plus de certitude que l'électrophorèse, l'individualité d'une protéine. C'est pourquoi nous avons tenté à la fois: 1. de confirmer l'individualité des constituants électrophorétiques grâce aux méthodes immunochimiques, et 2. inversement, de classer les constituants décelables immunochimiquement parmi les fractions électrophorétiques définies par leur vitesses de migration. La méthode qui suit a été élaborée dans ce double but.

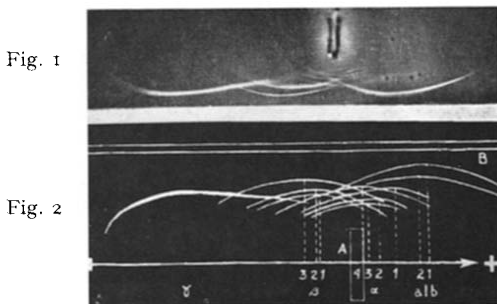
L'appareillage que nous utilisons pour effectuer une électrophorèse dans un gel de gélose est plus simple que celui de GORDON *et al.*<sup>1</sup>, il ne comprend pas de réfrigérant, et rappelle ceux qu'on emploie pour l'électrophorèse sur papier. On prépare un gel de gélose à 3 % dans une solution tampon sur une plaque de verre soigneusement nivelée; des morceaux de papier-filtre partiellement inclus dans le gel assurent sa jonction avec les vases contenant des électrodes en platine. Un courant de la solution-tampon traverse ces vases pour éviter des variations du pH. On a constaté qu'avec un tampon au véronal de pH = 8 et de force ionique = 0.05 l'électroendosmose, que nous ne sommes pas encore arrivés à éviter complètement, est moins prononcée. L'électrophorèse est faite dans une enceinte fermée, à la température ordinaire; durée 15-18 heures; environ 1 volt/cm dans le gel; 15-20 milliampères.

Le produit à analyser, ici du sérum humain normal dialysé contre le tampon choisi, est mélangé à la gélose à 40° et versé dans une cuvette moulée ou découpée dans la plaque de gélose (en A, Fig. 2).

Lorsque l'électrophorèse est terminée on découpe dans cette plaque, parallèlement à la direction de la migration, une fente (B, Fig. 2) qu'on remplit du réactif révélateur, ici un sérum de Cheval antisérum humain très riche en anticorps. Ces derniers en diffusant dans le gel précipitent avec leurs antigènes homologues et forment des lignes de précipités distinctes lorsqu'il s'agit de composés différents, comme dans la technique d'OUCHTERLONY<sup>2</sup>, déjà utilisée par nous avec le même antisérum<sup>3</sup>. Des photographies faites directement sur papier photographique permettent de suivre le développement de ces précipitations. La Fig. 1 est une photographie obtenue après 5 jours de diffusion; Fig. 2 est un schéma du même essai après 10 jours.

Dans ces expériences nous avons pu constater l'existence, en tant que constituants distincts, d'au moins: 3 ou 4  $\alpha$ -globulines, de 3  $\beta$ -globulines et peut-être même de deux fractions d'albumine; d'autres essais nous font penser qu'il y a plus d'une  $\gamma$ -globuline. L'analyse détaillée des diagrammes électrophorétiques obtenus avec l'appareillage de TISELIUS a déjà suggéré la possibilité de l'existence de plusieurs sous-fractions. Du fait que le sérum humain normal employé pour l'immunisation du Cheval n'a subi aucune manipulation, nous pouvons bien affirmer que la présence d'anticorps différents prouve l'existence distincte de ces nombreux constituants. Nous avons même des raisons de penser que des constituants supplémentaires, quantitativement moins importants, pourraient être mis en évidence, et que ceux que nous décrivons pourraient être des "groupes de protéines" voisines mais non identiques<sup>4</sup>.

Ces essais ne sont que préliminaires et nous nous rendons compte de la nécessité de perfectionner nos techniques, mais nous voudrions souligner les avantages de cette méthode qui permet en une seule expérience, avec très peu de produit et un minimum possible d'altération de son état naturel, de relier entre elles deux propriétés différentes des protéines: charges et groupements antigéniques. Cette méthode peut également servir pour vérifier la pureté d'une protéine ou pour étudier des enzymes (ou autres protéines actives), car dans de nombreux cas il serait facile d'effectuer directement dans le gel des épreuves de leur activité en remplaçant l'emploi d'un immunosérum (ou en le complétant) par celui d'une solution du substrat. Des essais de ce genre sont envisagés.



## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. H. GORDON, B. KEIL, K. SEBESTA, O. KNESSL ET F. SORM, *Coll. Trav. Chim. Tchécosl.*, 15 (1950) 1.
- <sup>2</sup> O. OUCHTERLONY, *Arkiv Kemi, Mineral., Geol.*, 25 (B) (1948) 14;  
M. KAMINSKI ET O. OUCHTERLONY, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 758.
- <sup>3</sup> P. GRABAR ET C. LAPRESLE, *2ème Congrès Intern. Biochimie, Résumé des communications*, Paris 1952, page 390.
- <sup>4</sup> P. GRABAR, *Les Globulines du sérum sanguin*, Désoer, Liège (1947).

Reçu le 8 décembre 1952