

insulin centrifuged off and washed repeatedly with dry ether. Under these conditions there was complete esterification of all the carboxyl groups⁴.

Esterified insulin showed no increased uptake of glucose with the rat diaphragm. This is in agreement with previous work using other biological tests¹⁻⁷. Furthermore, esterified insulin did not affect the increased uptake caused by insulin (Table II).

I wish to thank Professor F. G. YOUNG, F.R.S. and Dr. F. SANGER, F.R.S. for their interest in this work.

Department of Biochemistry, Cambridge (Great Britain)

D. S. H. W. NICOL*

¹ J. GROEN, C. E. KAMMINGA, A. F. WILLEBRANDS AND J. R. BLICKMAN, *J. Clin. Invest.*, 31 (1952) 97.

² P. J. RANDLE, *J. Endocrinol.*, 13 (1956) 1.

³ F. SANGER, *Biochem. J.*, 44 (1949) 126.

⁴ W. F. MOMMAERTS AND H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 909.

⁵ F. H. CARR, K. CULHANE, A. T. FULLER AND S. W. F. UNDERHILL, *Biochem. J.*, 23 (1929) 1010.

⁶ K. FREUDENBERG, W. DIRSCHERL, H. EICHEL AND E. WEISS, *Hoppe-Seyl. Z.*, 202 (1931) 159.

⁷ M. B. GLENDENNING, D. M. GREENBERG AND H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 125.

Received December 1st, 1958

* Beit Memorial Fellow for Medical Research.

Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel: l'électrosynérèse

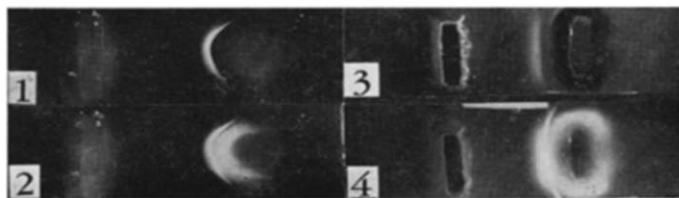
L'analyse immunochimique dans un gel (A.I.G.)^{1,2} est actuellement la méthode de choix pour le dénombrement et l'identification des mélanges d'antigènes. Mais dès qu'il s'agit d'antigènes de poids moléculaire élevé, la faible diffusion de l'antigène fait que les lignes de précipité sont lentes à apparaître et se forment soit à l'interface antigène-gélose, soit dans la couche d'antigène où elles sont difficilement distinguables les unes des autres. La séparation préalable des différents antigènes par électrophorèse de zone, telle qu'elle a été utilisée par POULIK³, par GRABAR ET WILLIAMS⁴ et par SLATER⁵ est suivie, dans ces techniques, d'une diffusion double, avec les inconvénients signalés plus haut.

J'ai donc cherché à provoquer la précipitation immunochimique *au cours de la migration* convergente de l'antigène et de l'anticorps dans une plaque de gélose soumise à un champ électrique. En effet, la plupart des anticorps ayant une mobilité électrophorétique (à pH < 9) inférieure à la vitesse du frot electroosmotique dans les mêmes conditions, les anticorps se déplacent vers la cathode alors que tous les antigènes ayant des mobilités absolues de $-2 \cdot 10^{-5}$ à $-6 \cdot 10^{-5}$ V $^{-1}$ cm 2 se déplaceront vers l'anode.

Si l'on dispose la solution gélosée d'anticorps vers l'anode et celle d'antigène vers la cathode, dans des cavités pratiquées dans une plaque de gélose (en utilisant un dispositif déjà décrit⁶), qu'on soumet à un champ de l'ordre de 5 V/cm, on obtient la rencontre des réactifs et leur précipitation locale après un temps court.

Les Figs. 1 et 2 sont des photographies prises après 30 (Fig. 1) et 75 min (Fig. 2) d'une électrosynérèse (E.S.) comportant de la sérum albumine humaine purifiée (1 mg/ml) dans la cavité cathodique et l'immunsérum homologue de lapin dans la

cavité anodique. Gélose à 1.25 %. Tampon tris (hydroxymethyl)aminométhane: pH = 7.2, I = 0.1. Champ 5 V/cm. Température ambiante: 22°. Distance des cavités: 2 cm. Le précipité apparaît 30 min après l'établissement du courant.



Figs. 1-4.

Un raisonnement très simple indique que le temps nécessaire à l'apparition du premier précipité ne dépend que de la distance entre les cavités et des mobilités des constituants à l'exclusion du mouvement électroosmotique. Ceci n'est vrai que dans la mesure où le seul mouvement liquide dans le milieu est l'électroosmose⁶ (qui est un mouvement continu et uniforme*).

Le précipité spécifique, qui est immobile, apparaît bien avant que les constituants aient atteint, en ce lieu, le maximum de leur concentration, ce qui interdit de déduire de sa position la mobilité électrophorétique moyenne de ces constituants. Cette précipitation précoce révèle la microhétérogénéité de charges électriques des molécules d'anticorps et de sérum albumine: le précipité apparaissant dès la rencontre des molécules d'anticorps les moins électronégatives et des molécules d'albumine les plus électronégatives. Cette microhétérogénéité a d'ailleurs été clairement établie par la technique de réversion de polarité, pour l'électrophorèse en cellule, par ALBERTY⁸ pour la sérum albumine.

L'association de l'A.I.G. à l'E.S. peut se faire en disposant ultérieurement, de part et d'autre de l'axe de progression électrophorétique, des tranchées remplies: l'une d'immunsérum, l'autre d'antigène. La continuité des lignes d'E.S. et d'A.I.G. indique bien que les premières représentent des précipités immunochimiques spécifiques. Enfin cette association permet de constater qu'après la formation du premier précipité d'E.S., des complexes solubles par excès d'antigène et peut-être même de l'antigène libre ont traversé ce précipité et peuvent précipiter ultérieurement au cours de l'A.I.G.

L'E.S. a été appliquée à une protéine de poids moléculaire élevé: l'hémocyanine d'escargot et à son immunsérum homologue. Dans les conditions ci-dessus, le précipité apparaît au bout de 110 min (Fig. 3) alors que l'A.I.G. ne donne de précipité appréciable qu'après plusieurs jours (Fig. 4).

Des mélanges d'antigènes de haut poids moléculaire (extraits d'*Escherichia coli*) ont été soumis à l'E.S. Si l'on dispose les différents extraits sur un axe perpendiculaire à celui du champ, dans des cavités presque contiguës, on obtient ainsi rapidement des lignes de précipités spécifiques et l'on peut repérer leurs parentés antigéniques.

Les activités spécifiques de ces constituants (par exemple enzymatique) peuvent

* La rencontre et la précipitation de l'antigène et de l'anticorps a été effectuée, sur papier, dès 1953⁷, mais fait appel, dans ce cas, non seulement à l'électroosmose, mais aussi aux mouvements liquides dus à l'évaporation.

être, soit révélées localement, soit dosées après élution de la gélose coupée en segments parallèles.

Il est enfin possible d'appliquer l'E.S. à un mélange d'antigènes préalablement soumis à une électrophorèse en gélose, l'axe du champ électrique de l'E.S. étant perpendiculaire au premier axe de progression; on obtient ainsi les résultats de l'analyse en quelques heures (les γ -globulines antigènes ne pouvant pas, évidemment, être étudiées ainsi). L'E.S. a d'ailleurs été appliquée, indépendamment⁹, à l'étude de la réaction des virus avec leurs anticorps homologues, avec des résultats très encourageants.

Il semble donc que l'E.S. fournit une méthode simple et rapide d'étude des différents antigènes d'un mélange, en particulier ceux de poids moléculaire élevé. Elle permet également de suivre le comportement électrophorétique des complexes solubles formés au cours de la réaction.

Service de Biochimie Cellulaire
Institut Pasteur, Paris (France)

ALAIN BUSSARD
avec la collaboration technique de
Mme J. HUET

¹ J. OUDIN, *Compt. rend.*, 222 (1946) 115.

² J. OUDIN, *Ann. inst. Pasteur*, 89 (1955) 531.

³ M. D. POULIK, *Can. J. Med. Sci.*, 30 (1952) 417.

⁴ P. GRABAR ET C. A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.

⁵ R. J. SLATER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 33.

⁶ A. BUSSARD ET D. PERRIN, *J. Lab. Clin. Med.*, 46 (1955) 689.

⁷ M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE, J. M. DUBERT ET M. BRUNERIE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 334.

⁸ J. ALBERTY, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 1675.

⁹ FAZEKAS DE ST. GROTH, Communication personnelle.

Reçu le 7 novembre, 1958

Multiple forms of lactic dehydrogenase in rabbit cornea

The cornea has been shown¹ to contain a highly active LDH. The high enzyme activity and its apparent localization in the epithelium has stimulated further interest in rabbit corneal LDH. This communication demonstrates that when soluble proteins are extracted from rabbit cornea and resolved by anion-exchange chromatography, three forms of LDH are detected.

Extracts were prepared from whole cornea, epithelium-endothelium and stroma. The latter two were obtained after denuding the stroma by scraping both sides of the cornea with a scalpel blade. The tissues were homogenized in 2 vol (w/v) 0.1 M phosphate buffer, pH 7.1, and centrifuged at 34,800 \times g for 60 min. The supernatant fluids were dialyzed overnight against 0.005 M phosphate buffer, pH 7.1, and cleared at 34,800 \times g for 60 min. All operations were carried out in the cold.

DEAE columns (0.9 \times 10 cm) were prepared according to the methods of PETERSON AND SOBER². The extract was applied to the column and eluted with a convex gradient of increasing chloride concentration (see Fig. 1). Protein content³, pH and LDH activity^{4,5} were determined in each column fraction. LDH activity in

Abbreviations: LDH, lactic dehydrogenase; DEAE, diethylaminoethylcellulose; DPNH, reduced diphosphopyridine nucleotide.