

Preliminary Notes

Etude électrophorétique des antigènes de la transplantation

Les antigènes de la transplantation se présentent habituellement sous forme de préparations opalescentes dont ils peuvent être séparés par centrifugation à grande vitesse^{1,2}. Cependant, BILLINGHAM, BRENT ET MEDAWAR d'une part¹, ORTH ET CASTERMANS, d'autre part³, ont indiqué des procédés permettant de solubiliser les antigènes de la transplantation. Le pouvoir antigénique de ces préparations est toutefois très instable. Le but de la présente étude a été d'obtenir la séparation de fractions antigéniques solubles par électrophorèse sur papier de verre (Hurlbut no. 934 - AH).

Trois types de préparations antigéniques ont été soumis à l'électrophorèse: (a) l'extrait en NaCl 0.15 M, citrate sodique 0.01 M, pH 7^{2,3}; (b) la préparation obtenue par salting out au sulfate ammonique à 50 % de saturation, de la préparation A^{2,3}; (c) l'extrait obtenu par gélification des cellules en eau distillée suivant BILLINGHAM, BRENT ET MEDAWAR¹. Dans tous les cas le matériel de départ consistait en cellules spléniques et thymiques de souris de souches Albino Swiss et C57 BL. Le test d'antigénicité a consisté en l'élimination accélérée des greffes cutanées transplantées sur des animaux sensibilisés par l'antigène présumé³. Les électrophorèses ont été réalisées au moyen d'une cellule SPINCO C.P., permettant de recueillir 16 fractions (tampon Na₂HPO₄ 0.01 M, pH 7.5; réfrigération à 0°; opération 8 à 10 h; voltage constant 500 V et intensité oscillant aux environs de 50 mA). L'amidoschwarz a été utilisé pour la coloration sur papier des protéines, et le Schiff pour la coloration des glycoprotéines. Les acides nucléiques ont été décelés au moyen de la lampe Mineralight, S.L. 2537. Des dosages colorimétriques ont été réalisés par les méthodes suivantes: (1) FOLIN-CIocalteu⁴ pour les protéines; (2) BIAL⁵ pour l'ARN; (3) H₂SO₄-orcinol⁶ pour les hexoses.

L'électrophorèse des trois préparations A, B, et C a donné des résultats fort comparables. Au cours de l'expérience, apparaît une traînée verticale de coloration beige. Son intensité, maximum au point d'alimentation, se réduit progressivement vers le bas, mais atteint néanmoins le bord inférieur du papier dans la plupart des cas. Elle est constituée de matière insoluble qui est recueillie dans le tube immédiatement sous-jacent. Dans un cas, toute trace de matière insoluble a disparu avant le bord inférieur du papier, ce qui suggère que la totalité de la matière mise en expérience a été dissociée et solubilisée par le champ électrique. L'activité antigénique a été retrouvée: 1° - dans la fraction insoluble, recueillie à la verticale du point d'alimentation, dans les cas de solubilisation partielle; 2° - dans les fractions recueillies entre 15 et 23 cm de la perpendiculaire du point d'alimentation, du côté de la cathode, dans tous les cas. L'analyse élémentaire de toutes les fractions solubles actives a donné des résultats identiques; protéines, 85%; ARN, 12%; galactose-manoose 2-3%. Les doses injectées, donnant une réponse positive, ont été de l'ordre de 60 à 150 µg de N par souris. Mais ces chiffres ne peuvent préjuger du seuil d'activité de ces fractions solubles.

Abréviations: ARN, acide ribonucléique; ADN, acide deoxyribonucléique.

L'électrophorèse permet donc d'obtenir des fractions solubles douées de pouvoir antigénique. Sauf dans un cas, la solubilisation du matériel antigénique de départ n'a toutefois été que partielle. L'analyse chimique des fractions solubles actives est superposable à celle des fractions obtenues par chromatographie sur phosphate calcique par OTH ET CASTERMANS³. Ces faits suggèrent que le pouvoir antigénique pourrait être supporté par une glycoprotéine, dont la forte charge positive expliquerait les caractères particuliers de solubilité et peut être aussi l'affinité pour l'ARN (ou l'ADN⁷ dans certains cas).

Ce travail a été réalisé avec l'assistance technique de Messes C. HENIN et M. PROTIN.

- ¹ R. E. BILLINGHAM, L. BRENT AND P. B. MEDAWAR, *Transpl. Bull.*, 5 (1958) 377.
- ² A. CASTERMANS AND A. OTH, *Nature*, 184 (1959) 1224.
- ³ A. OTH AND A. CASTERMANS, *Transpl. Bull.*, 6 (1959) 418.
- ⁴ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR AND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ⁵ Z. DISCHE, in E. CHARGAFF AND J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Academic Press, New York, 1955.
- ⁶ R. J. WINZLER, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Interscience Publ., New York, 1955.
- ⁷ R. E. BILLINGHAM, L. BRENT AND P. B. MEDAWAR, *Nature*, 178 (1956) 514.

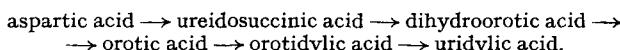
*Laboratoire de la Clinique Chirurgicale, Université de Liège et ANDRÉ CASTERMANS
Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgique)*

Received July 16th, 1960

Biochim. Biophys. Acta, 43 (1960) 136-137

Elimination by the urine of orotic acid and orotidine in man after application of 6-azauracil

The principal pathway of biosynthesis of the pyrimidine components of nucleic acids can be characterized by the sequence of the intermediates:



the key positions being occupied by derivatives of orotic acid^{1,2}. Their isolation from biological material, however, is quite complicated. Orotic acid³ and later even dephosphorylated orotidyllic acid, orotidine⁴, have been isolated only from some mutants of *Neurospora crassa*, deficient with respect to decarboxylase of orotidyllic acid. The older detection of orotic acid in milk can be considered nowadays rather as a curiosity⁵.

New possibilities were provided by the application of 6-azauracil which—as was found subsequently—is transformed to 6-azauracilriboside 5'-phosphate^{6,7} and as such inhibits the decarboxylase of orotidyllic acid⁸. Inhibition of *Escherichia coli* cultures by 6-azauracil resulted in an accumulation of orotic acid⁶ or—with some strains—of orotidyllic acid⁹ in the medium. At the same time, it was established that orotic acid and orotidine are eliminated en masse by the urine of normal and tumour-bearing mice treated with 6-azauracil or with its riboside^{7,10}, which served actually as the first direct proof of existence of a similar type of compounds in higher animals. Later, the compounds were identified even in acid extracts of tumours of animals which were treated with 6-azauracilriboside¹¹. The present communication contains