

Précipitation de fractions protéiques du sérum par la chlorpromazine

Sacrifiant à un thème d'actualité (Interaction Protéines-Médicaments), nous cherchions à étudier les modalités de fixation, in vitro, de la chlorpromazine (largactil) sur les fractions du sérum. Inspiré par la publication de résultats contradictoires, ou non convaincants, obtenus in vivo¹⁻⁷, ce travail nous a conduit à observer des phénomènes de précipitation qui ne nous paraissent pas dénués d'intérêt.

Méthodes. 1) Dosage des protéines totales au moyen de la réaction du biuret (technique d'ARDRY⁸). 2) Electrophorèse en cellule: appareil Strübin Fokal B; tampon barbital acide barbital sodique (pH 8,6; force ionique 0,1); dialyse pendant 24 h, à + 4°C contre ce tampon; voltage, 250 V; ampérage, 20 mA; température, + 4°C $\pm$ 0,05°C; durée de migration, 9000 sec; angle 45°; coefficient d'agrandissement, 0,222. 3) Electrophorèse sur papier: appareil GROULADE⁹; papier Schleicher et Schüll 2043 a Mgl; solution conductrice, barbital (pH 8,6; force ionique 0,1); dépôt variable selon les fractions à caractériser (5-10 μ l pour les protéines, 40 μ l pour les glycoprotéines et les lipoprotéines); voltage, 110 V; durée de migration, 15 h; fixation par séchage sous rayonnements IR. 3a) Estimation du % des fractions protéiques séparées après coloration par le Vert de Lissamine et décoloration du fond papier d'après GORRINGE¹⁰, lecture et intégration au Titromatic Quéré, sans translucidation ni recours aux coefficients de correction. 3b) Approximation densitométrique du taux des glycoprotéines après coloration PAS (GROULADE⁹) et du rapport lipoprotéines lentes (α LP + trainée t)/lipoprotéines rapides (β LP) après coloration par trempage d'une heure dans l'éthanol à 50° demi-saturé à froid par le Noir Cérol B (RAL Kuhlmann). 3c) Révélation de la chlorpromazine par le réactif à l'iodoplatinate de potassium¹¹ (décoloration du fond papier par rinçage à l'eau). 4) Microimmuno-

électrophorèse (méthode de SCHEIDEGGER¹²); immun-sérum de cheval anti-sérum humain normal de l'Institut Pasteur mixte (223-306); témoin, sérum humain normal ramené à isoconcentration en protéines; coloration des protéines par l'Amidoschwarz et des lipoprotéines par le Noir Cérol B (RAL Kuhlmann).

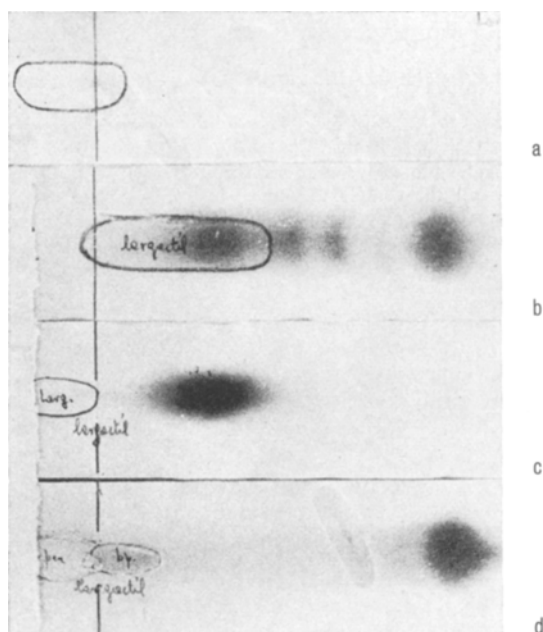


Fig. 1. Electrophorèse sur papier (cf. A). a: chlorpromazine seule. b: mélange chlorpromazine + sérum humain. c: mélange chlorpromazine + γ -globulines humaines. d: mélange chlorpromazine + albumine humaine.

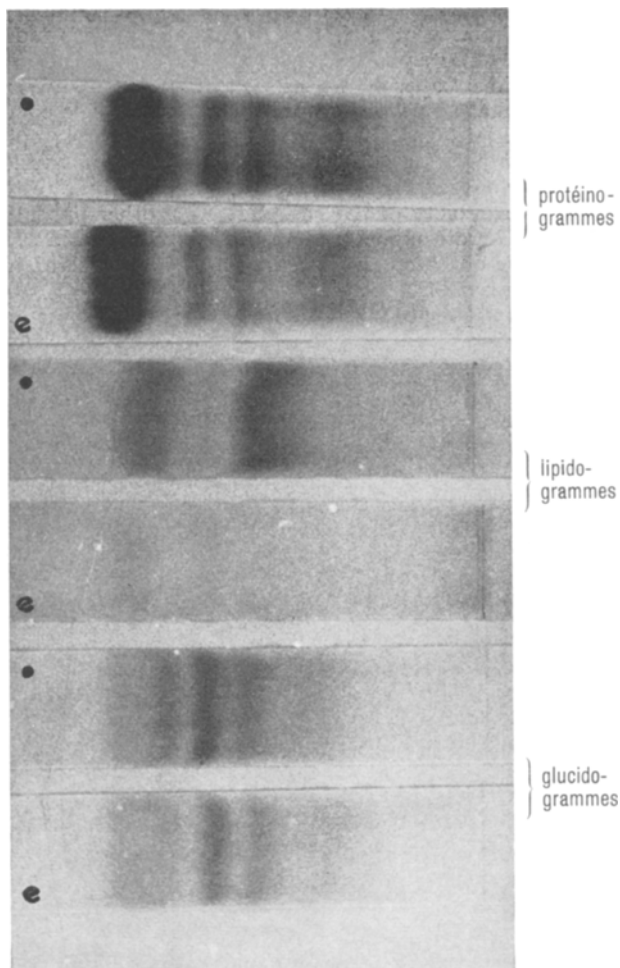


Fig. 2. Electrophorèse sur papier (cf. B₁). ●, témoin; e, essai

¹ R. CHRISTE, *Encéphale* 4, 645 (1956).

² P. DUBOST et S. PASCAL, *Etude des protéines sériques de malades traités avec la Chlorpromazine, par la méthode de l'électrophorèse différentielle, en clinique psychiatrique*. Communication au 27^e Congrès de Chimie Industrielle, Bruxelles, 11-19 septembre 1954.

³ A. M. GIANNI et G. FRANCHI, *Acta anaesth. Padova* 4, 1 (1957).

⁴ P. K. KEPP, G. OEHLERT et H. KOCH, *Geburtsh. Frauenheilk.* 16, 212 (1956).

⁵ E. J. SKOUIN, *Revue Neuropsychiat. de Korsakof* 56, 307 (1956).

⁶ E. ZOLLER, K. SCHREIER et P. R. YANG, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 238 (1958).

⁷ M. ZYDOWO et Z. KAMINSKI, *Polski Tygod. lek.* 12-15, 549 (1957); *Excerpta med.* 11, 412 (1958).

⁸ R. ARDRY, *Annls Biol. clin.* 7, 407 (1949).

⁹ J. GROULADE, *Electrophorèse sur papier (Appareil et Techniques)* (Imp. Allier, Grenoble 1961), I tome.

¹⁰ J. GORRINGE, *Clinica chim. Acta* 2, 353 (1957).

¹¹ Préparation de ce réactif: dissoudre 1 g de tétrachlorure de platine dans 10 ml d'eau distillée, ajouter 250 ml d'une solution d'iodure de potassium à 4% et compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.

¹² J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 7, 103 (1955).

Tableau I. Résultats obtenus en électrophorèse sur papier

	Protéinogramme		Glucidogramme		Lipidogramme	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
	%	%	%	%	%	
Albumine	54,8	54,9	27,1	33,9		
Globulines- α_1	4,4		13,9			
Globulines- α_2	11,5	9,9	30,7	21,8	α LP %	22
Globulines- β	13,2	10,9	20,4	21,3	β LP + t	78
Globulines- γ	16,1	24,3	7,9	23,0		
A/G =	1,22	1,27			β LP + t/ α	3,5

Tableau II. Résultats obtenus en électrophorèse libre

	Témoin	Essai
	%	%
Albumine	49,5	53,8
Globulines- α_1	4,4	2,5
Globulines- α_2	5,6	7,5
Globulines- α_3	4,4	6,0
Globulines- β_1	12,3	10,0
Globulines- β_2	4,2	1,9
Globulines- γ	19,6	18,3
A/G =	0,98	1,16

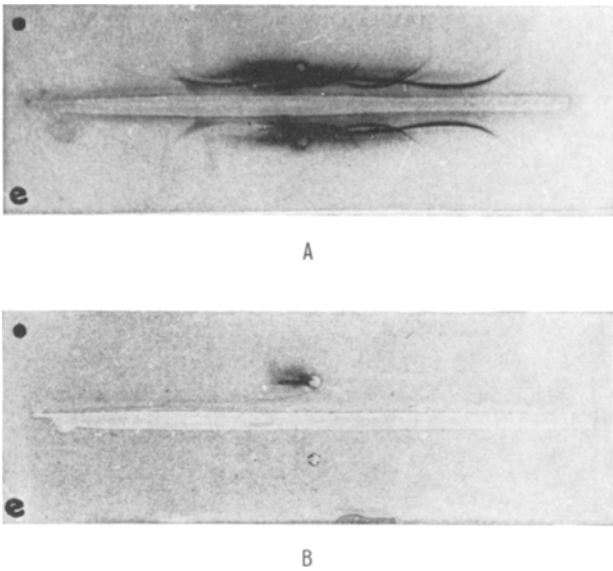


Fig. 4. Contrôle immunoélectrophorétique (cf. B₃). A, protéines; B, lipoprotéines; ●, témoin; e, essais.

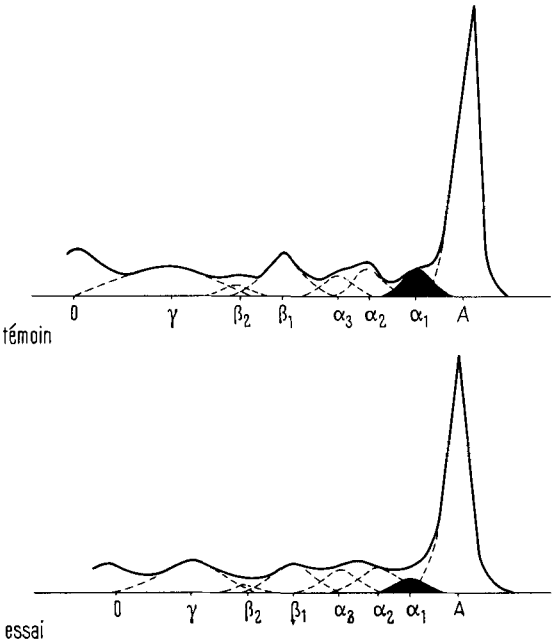


Fig. 3. Electrophorèse en veine liquide (cf. B₂).

Résultats. A) Après incubation, pendant 1½ h, à la température du laboratoire, de mélanges chlorpromazine-sérum, γ -globulines, albumine d'origine humaine, dans les rapports substance organique-protéines totales respectifs de 1/100, 1/80, 1/45, et électrophorèse sur papier, les

résultats globaux suivants sont obtenus: Alors que la chlorpromazine en solution pure migre vers la cathode (Figure 1a), elle se révèle au niveau des fractions sériques de faible mobilité (Figure 1b), elle ne semble pas s'associer aux γ -globulines en conservant sa mobilité catodique (Figure 1c), elle subit, sous l'influence de l'albumine, un entrainement anodique, sans combinaison (Figure 1d). B) Lors de l'augmentation des concentrations relatives de la chlorpromazine dans le sérum, ce dernier subit une évolution vers la précipitation. Dans les limites imposées par une première expérimentation, l'observation la plus significative correspond au mélange 1 partie de médicament pour 10 parties de protéines totales (en poids). Sur le surnageant de la centrifugation à 6000 t/mn, pendant 15 min, succédant à une précipitation de 4 h à + 37°C: B₁) L'électrophorèse sur papier (Figure 2), témoigne de la disparition des α_1 -globulines révélées comme protéines et glycoprotéines. Le lipidogramme marque une forte diminution du pourcentage des fractions lentes, avec rassemblement sur la ligne de départ; le Tableau I rapporte les variations quantitatives homologues; B₂) En veine liquide, les modifications électrophorétiques constatées (Figure 3 et Tableau II) portent essentiellement sur les gradients α et β ;

B₃) La révélation immunochimique des protéines (Figure 4a) et des lipoprotéines (Figure 4b) confirme la disparition des protéines de mobilité directement inférieure à celle de l'albumine et des fractions lipidoprotidiques.

Discussion-conclusion. Le premier groupe de résultats n'autorise guère d'interprétation directe. Plus intéressantes apparaissent les données fournies par le second groupe, car il n'est pas de contradiction formelle entre les modifications du sérum dévoilées par électrophorèse en cellule, et celles que traduisent les deux autres techniques. A côté d'une interaction lipoprotéines-chlorpromazine, il apparaît, dans les conditions décrites, une plus inattendue précipitation de globulines- α_1 .

Les doses qui provoquent ces modifications diffèrent largement des doses thérapeutiques. Mais, pour donner plus de poids à la notion de chlorpromazine (ou de phénothiazine) comme réactif d'intérêt biochimique, il faut ajouter de sérieux arguments: précisions sur les paramètres de l'interaction, nature des liaisons formées, transformations structurales, sélection dans la précipitation des différentes protéines, applications éventuelles, etc.

Ces problèmes théoriques et pratiques font l'objet d'études en cours.

Summary. In vitro, the mixture 'Chlorpromazine-human serum' gives modifications of the lipoproteins and the α -globulins. These modifications are studied by paper electrophoresis, Tiselius-electrophoresis, and immunoelectrophoresis. Under the experimental conditions described, the selective precipitation of the α_1 -globulins seems quite unexpected.

P.-C. THIERCELIN, B. QUINTARD
et J. SAINT-BLANCARD
avec la collaboration technique de
Mlle A. BECAT

Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée
«Jean Julliard», Division d'Hémobiole du Centre
de Recherches du Service de Santé des Armées,
Clamart (France), le 29 novembre 1965.

A Protein Fraction in Locust Hemolymph Associated with the Moulting Cycle

A number of studies have shown that hemolymph proteins change during development in insects. Most of these studies have been made on holometabolous insects, especially on *Hyalophora cecropia*^{1,2}, on *Drosophila*³⁻⁵, and on *Culex*^{4,6}, while only a few have been made on hemimetabolous forms⁷⁻⁹. STEINHAEUER and STEPHEN⁷ noted changes in blood proteins during the development of *Periplaneta* using paper electrophoresis, while MISSELIJN, KARCHER, DE KEYSER, and VAN SANDE⁸ studied the hemolymph proteins of immature and mature hemipterans of the genus *Triatoma* by means of agar gels. More recently COLES⁹ has examined starch electropherograms of the hemolymph of fifth instar and adult *Rhodnius*. In the present investigation, which is concerned with the cyclical appearance of one particular protein band in the electrophoretic pattern of the hemolymph of the locust, *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche and Fairm.), horizontal starch electrophoresis was used since this technique allows much greater resolution. This protein fraction has been found to be present in each of the instars during the development of the locust, appearing immediately prior to the moult and disappearing soon thereafter. No attempt will be made to discuss the overall pattern of proteins occurring in the hemolymph and their changes with development since these will be covered in a future publication.

Methods. Locusts from stock provided by the Anti Locust Research Council, were reared under the conditions described by HUNTER-JONES¹⁰. Hemolymph samples were obtained by allowing the cut limb sockets of the locust to drain directly on to 5 mm squares of Whatman's No. 3 filter paper which were then inserted into the gel. Zone electrophoresis of the hemolymph was carried out in starch gels¹¹, the hydrolysed starch having been obtained from the Connaught Medical Research Laboratories and prepared according to their directions. The semi-discontinuous buffer system used was that of POULIK¹² as modified by FERGUSON and WALLACE¹³. The

pH of the buffer was 8.5 and a voltage gradient of 10 V per cm was maintained across the gel for 3 h at a temperature of 5°C. The gel was sectioned horizontally into two equal portions each of which was stained for 3 min in a saturated solution of Naphthylene Black 10B in methanol-acetic acid-water¹¹.

Results. A total of 19 distinct hemolymph protein fractions has been demonstrated during the development of the locust, but the complete number has never been found to be present in any one developmental stage (e.g. in the early 3rd instar hemolymph, 11 bands occur). On the whole the band pattern is fairly constant throughout the locusts' development until such time as the animals become sexually mature¹⁴. The hemolymph band patterns for the period prior to and immediately after the second moult are shown in the accompanying Figure. Of particular interest is band 14 which is absent in the intermoult period but which appears a short time prior to the moult. It increases in staining intensity to reach a maximum at the time of moulting and thereafter decreases

¹ W. H. TELFER and C. M. WILLIAMS, J. gen. Physiol. 36, 389 (1953).

² H. LAUFER, Ann. N.Y. Acad. Sci. 89, 490 (1960).

³ C. WUNDERLY and H. GLOOR, Protoplasma 42, 273 (1953).

⁴ P. S. CHEN, Revue suisse Zool. 66, 280 (1959).

⁵ E. J. DUKE and E. M. PANTELOURIS, Comp. Biochem. Physiol. 10, 351 (1963).

⁶ V. ZAMEN and W. T. CHELLAPPAH, Expl. Parasit. 13, 108 (1963).

⁷ A. L. STEINHAEUER and W. P. STEPHEN, Ann. ent. Soc. Am. 52, 733 (1959).

⁸ G. MISSELIJN, D. KARCHER, F. DE KEYSER, and M. VAN SANDE, *Protides of the Biological Fluids*, Proc. of the 7th Colloquium, Bruges 1959 (Elsevier, Amsterdam 1958).

⁹ G. C. COLES, J. Insect Physiol. 11, 1317 (1965).

¹⁰ P. HUNTER-JONES, *Instructions for Rearing and Breeding Locusts in the Laboratory* (Anti Locust Research Centre, London 1956).

¹¹ O. SMITHIES, Biochem. J. 61, 629 (1955).

¹² M. D. POULIK, Nature, Lond. 180, 1477 (1957).

¹³ K. A. FERGUSON and A. L. C. WALLACE, Nature, Lond. 190, 632 (1961).

¹⁴ F. W. MCCORMICK and A. SCOTT, unpublished.