

PROTIDES OF THE BIOLOGICAL FLUIDS

PROCEEDINGS OF THE SIXTEENTH COLLOQUIUM,
BRUGES, 1968

Edited by H. PEETERS

DIRECTOR OF THE SIMON STEVIN INSTITUTE AND OF THE
LABORATORY OF ST. JANS HOSPITAL, BRUGGE (BELGIUM)

OXFORD · LONDON · EDINBURGH · NEW YORK
TORONTO · SYDNEY · PARIS · BRAUNSCHWEIG

Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford
4 & 5 Fitzroy Square, London W.1
Pergamon Press (Scotland) Ltd., 2 & 3 Teviot Place, Edinburgh 1
Pergamon Press Inc., Maxwell House, Fairview Park, Elmsford,
New York 10523
Pergamon of Canada Ltd., 207 Queen's Quay West, Toronto 1
Pergamon Press (Aust.) Pty. Ltd., 19a Boundary Street,
Rushcutters Bay, N.S.W. 2011, Australia
Pergamon Press S.A.R.L., 24 rue des Écoles, Paris 5^e
Vieweg & Sohn GmbH, Burgplatz 1, Braunschweig

Copyright © Pergamon Press Ltd. 1969

*All Rights Reserved. No part of this publication may be reproduced,
stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any
means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise
without the prior permission of Pergamon Press Limited.*

First edition 1969

Library of Congress Catalog Card No. 58-9208

Printed in Hungary

08 013348 7 (hard cover)

Preface

THE Proceedings of the Sixteenth Colloquium are devoted to three main topics selected from the general field of protein chemistry. The biophysical topic is concerned with conformation and structure. The second topic is related to pathology and considers the proteins of bodily secretions. The third topic gives a selection of technical and methodological papers, a number of which are centered around electro-focusing.

Conformation and structure of protein molecules was introduced by papers discussing protein models. These models are either simple synthetic polypeptides or mechanical structures. In both instances it is the objective to simulate function through an appropriate representation of structure. The functional approach to conformation combines physiological significance with chemical and physical appearance of the protein. For enzymes such as lysozyme and for the immunoglobulins a fairly detailed insight into structure-function relationship has already been established. The dielectric and the optical behaviour of protein solutions were extensively considered and the results are the more interesting that they are obtained on intact proteins.

Proteins of bodily secretions are reviewed according to their organ of origin, but inside each organ proteins are grouped around their function. Protection against infection through immunoglobulins is extensively treated for the nasal and for the intestinal secretions. In milk, iron transport, and in gastric juice the B₁₂ transport acted as centres of interest. It seems that the study of proteins of bodily secretions leads the way towards the study of tissue proteins, which might turn out as a good topic for one of the next meetings.

In the technical section a new technique appeared, namely electro-focusing. A few papers discussing technical details about purification, identification or determination of given protein fractions have been collected under this heading.

The Academic Lecture was a comprehensive review of the immunology of proteins given by Professor Grabar, one of its founding fathers. It is a pleasure to remember that the first occasion for Professor Grabar

to bring his immunoelectrophoretic technique to the attention of the scientific world outside France was the Second Colloquium in 1954.

It has been a stimulating experience to steer this meeting through its sixteenth edition and to follow the development of protein research at the hand of the work from so many excellent research-groups.

DR. HUB. PEETERS

Acknowledgements

WE, the members of the Scientific Committee of the Sixteenth Colloquium, are glad to have the opportunity of expressing our sincere appreciation for the support given by the Provincial Government of West-Flanders.

The personal interest shown by the Governor, P. van Outryve d'Ydewalle Esq., Mr. L. Gillon and Mr. J. Storme, members of the Council, was of great help in our work.

It is a pleasure to thank the authorities of the city of Bruges, especially Mr. P. Vandamme, Burgomaster, as well as the President, Mr. R. Waes, and the members of the Public Assistance Committee, for their collaboration in the general organization of the congress.

The staff of the Simon Stevin Institute for Scientific Research has been the backbone of all the practical work throughout the preparation of the meeting and the editing of this book.

We are also indebted to many others, too numerous to mention, who gave unstintingly of their time and effort to make this colloquium a success.

The publication of these proceedings is supported by a grant from the Ministry for National Education.

Contents

PREFACE	xiii
ACKNOWLEDGEMENTS	xv
ACADEMIC LECTURE Analyses Immunochimiques des Tissus P. GRABAR (Paris, France)	1
SECTION A: CONFORMATION AND STRUCTURE OF PROTEINS	
A1. Protein Models	
Polypeptides as Models for the Tertiary Structure of Proteins T. J. GILL III (Boston, Mass., U.S.A.)	21
β -Lactoglobulin as a Model of Subunit Enzymes S. N. TIMASHEFF and R. TOWNEND (Waltham, Mass., U.S.A.)	33
Preferential Binding of Solvent Components to Protein in Mixed Water–Organic Solvent Systems H. INOUE and S. N. TIMASHEFF (Osaka, Japan)	41
Some Aspects of Protein Models and Biological Function S. LEWIN (London, Great Britain)	51
Uses and Limitations of Various Types of Atomic Models in Molecular Representation S. LEWIN (London, Great Britain)	65
Chemical, Morphological and Immunologic Properties of Recombined Red Cell Membranes P. ZÄHLER and E. WEIBEL (Bern, Switzerland)	71
A2. Conformation and Dielectric Behaviour	
Messungen der Dielektrizitätskonstanten von Hämoglobinstrukturänderungen in Wässriger Lösung mit einem Mikrowelleninterferometer mit Hochempfindlichem Detektor und unter Verwendung einer Durchflussküvette N. KAISER (München, Germany)	81
R. F. Measurements of the Dielectric Properties of Strongly Conducting Liquids J. D. M. WISSE, A. C. M. VAN DER DRIFT, D. ROSEN and R. BIGNALL (Leiden, Netherlands)	87
Size and Shape Determination of Globular Proteins. I. Bridge and Cell Problems in the Dielectric Measurement of Protein Solutions R. LAMOTE, A. DENOÛ and H. PEETERS (Brugge, Belgium)	95
Size and Shape Determination of Globular Proteins. II. Dielectric Relaxation and Viscosity Determination of Globular Proteins R. VERBRUGGEN, V. BLATON, M. Y. ROSSENEU-MOTREFF and H. PEETERS (Brugge, Belgium)	101

The Dipole Moment in Sperm Whale Myoglobin P. SCHLECHT (München, Germany)	109
A3. Structure by Optical Methods	
Application de la Diffusion de la Lumière a l'Étude de quelques Macromolécules Biologiques S. GUINAND (Orsay, France)	115
Optical Rotation Studies on Globular Serum Proteins and Isolated Polypeptide Chains of Immunoglobulins O. WETTER (Bochum, Germany)	127
On the β -Conformation in Eye-lens Proteins B. J. M. HARMSSEN and G. A. J. VAN OS (Nijmegen, Netherlands)	137
Messung der Optischen Rotationsdispersion von Nativer und Modifizierter Lactat-dehydrogenase sowie des Enzym-Coenzym-Komplexes D. JECKEL and G. PFLEIDERER (Bochum, Germany)	143
Circular Dichroism of the β -Lactoglobulins between 190 and 320 nm R. TOWNEND and S. N. TIMASHEFF (Waltham, Mass., U.S.A.)	149
A4. Structure by Other Methods	
Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Struktur von Fibrinfibrillen R. GOLLWITZER, H. E. KARGES, H. HÖRMANN and K. KÜHN (München, Germany)	155
Study of the Alkaline Bohr Effect of Hemoglobin by means of Differential Hydrogen Ion Titration Curves S. H. DE BRUIN and G. A. J. VAN OS (Nijmegen, Netherlands)	161
Kinetic Studies of Antibody-Hapten Reactions with the Temperature-jump Relaxation Technique A. FROESE, S. G. GOLDWATER and A. H. SEHON (Montreal, Canada)	167
A5. Structure of Lysozyme	
The Structure and Function of Lysozyme C. C. F. BLAKE (Oxford, Great Britain)	173
Relations entre Structure et Activité chez quelques Lysozymes de Blancs d'Oeufs d'Oiseaux et d'Origine Humaine P. JOLLÈS, J. JOLLÈS, A-C. DIANOUX, J. HERMANN and D. CHARLEMAGNE (Paris, France)	181
Constantes Apparentes d'Affinité de Lysozymes d'Origines Diverses pour <i>Micrococcus lysodeikticus</i> J. SAINT-BLANCARD, J. P. LOCQUET and P. JOLLÈS (Clamart, France)	191
Immunochemical Analyses of Human Lysozyme in Monocytic Dyscrasias F. W. TISCHENDORF and E. F. OSSERMAN (Tübingen, Germany)	197
A6. Structure of Immunoglobulins	
Structure and Cellular Localization of Secretory IgA J. A. O'DALLY and J. J. CEBRA (Baltimore, Md. U.S.A.)	205
The Secretory Immunologic System P. A. SMALL, Jr. and R. H. WALDMAN Gainesville, Fla., U.S.A.	221
Les Fragments de Protéolyse Enzymatique des IgM Globulines Humaines C. MIHAESCO and M. SELIGMANN (Paris, France)	227

Rapports des Equivalents Structuraux de la Gamma G et de la Gamma A vis à vis de Certaines Activités Biologiques 233

M. STEINBUCH, C. REUGE, R. AUDRAN, A. FAURE, M. M. ZAKIN and G. A. BOFFA (Paris, France)

A7. Structure of Various Proteins

Nature and Functions of Mucins and Blood Group Substances 241

W. PIGMAN and N. PAYZA (New York, N. Y., U.S.A.)

Dissociation of Human α_2 -Macroglobulin at Acid and Alkaline pH 247

J. J. PICARD and J. F. HEREMANS (Leuven, Belgium).

Structure Quaternaire des Alpha-2-macroglobulines Humaines Normales 255

C. GENTOU (Paris, France)

Untersuchungen zur Lokalisation der Insertionsstellen Insulinbindender Antikörper am Insulinmolekül 265

L. KERP, H. KASEMIR, S. STEINHILBER and F. KIELING (Freiburg, Germany)

SECTION B: PROTEINS OF BODILY SECRETIONS

B1. General Papers

Studies of One Specialized Local Antibody System 275

R. HONG, B. FELDMAN, R. HERDMAN and R. A. GOOD (Minneapolis, Minn., U.S.A.)

Studies on Immunoglobulins of Secretions in Dogs and Mice 383

J.-P. VAERMAN, D. R. NASH, P. A. CRABBÉ, H. BAZIN and J. F. HEREMANS (Leuven, Belgium)

The Fundamental Structure of the Glycoproteins in Mucous Secretions 287

A. GOTTSCHALK (Tübingen, Germany)

The Compositional Pattern of the Carbohydrates of Glycoproteins of Epithelial Secretions 293

Z. DISCHE, C. ROTHSCILD and A. DANINCHENKO (New York, N. Y., U.S.A.)

The Composition of Mucus with Special Reference to its Rheological Properties 299

R. A. GIBBONS (Nr. Newbury, Great Britain)

B2. Nasal Secretions

Factors Influencing the Production of Secretory IgA Antibody in Nasal Secretions 307

J. A. BELLANTI (Washington, D.C., U.S.A.)

The Biologic Significance of IgA in the Mucous Secretions: Response to Oral Polio Vaccine in IgA-deficient Subjects 315

M. A. SOUTH, M. FIGUEROA W. BUTLER, R. ROSSEN, and W. RAWLS (Houston, Tex., U.S.A.)

Localization of External Secretory IgA Piece by Immunofluorescence in Tissues from Patients with Agammaglobulinemia 325

R. D. ROSSEN, M. A. SOUTH and W. T. BUTLER (Bethesda, Md., U.S.A.)

Local Synthesis of Immunoglobulin G in the Upper Respiratory Tract 331

W. T. BUTLER, R. D. ROSSEN and T. A. WALDMANN (Houston, Tex., U.S.A.)

Protein and Lipid Pattern in Serous Otitis Media 337

P. VAN DE CALSEYDE, V. BLATON, H. GOETHALS, W. AMPE and H. PEETERS (Brugge, Belgium)

B3. Bronchial Secretions

- Biochemical Exploration of Bronchial Hypersecretions 343
 R. HAVEZ, P. ROUSSEL, P. DEGAND, A. RANDOUX and G. BISERTE (Lille, France)
- Etude des Glycopeptides du Mucus Fibrillaire de la Sécrétion Bronchique 361
 P. DEGAND, P. ROUSSEL, A. RANDOUX, Y. MOSCHETTO and R. HAVEZ (Lille, France)
- Secretions of Proteins into the Sputum in Chronic Bronchitis 371
 L. BONOMO, V. LISO, F. TEDESCO, F. P. SCHENA and U. GILLARDI (Bari, Italy)

B4. Gastro-Intestinal Secretions**—Saliva**

- Mucous in Normal Human Submaxillary Saliva 379
 J. C. PALLAVICINI, U. N. WIESMANN and P. A. DI SANT'AGNESE (Bethesda, Md., U.S.A.)
- Der Nachweis von M-Komponenten der Immunglobuline im Speichel von Patienten mit Paraproteinämien 385
 F. GABL (Innsbruck, Austria)

—Gastric Juice

- The Relation between the Histology of the Gastric Mucosa, Secretion of Intrinsic Factor, Autoimmunity and the Absorption of Vitamin B₁₂ 393
 K. D. BARDHAN, A. G. WANGEL, R. WHITEHEAD, R. WRIGHT, G. H. SPRAY, G. T. WARNER and S. T. E. CALLENDER (Oxford, Great Britain)
- The Vitamin B₁₂, Transport Proteins in Body Fluids and Leucocytes 401
 R. GRÄSBECK (Helsingfors, Finland)
- Etude de Deux Transporteurs de Vitamine B₁₂, Isolés de la Muqueuse Gastrique de Porc 409
 R. HAVEZ, A. CARLIER, C. BOULANGER and G. BISERTE (Lille, France)
- Autoimmunization to Intrinsic Factor and Immunization to Oral Hog Intrinsic Factor in Man—Some Characteristic Features 423
 R. GULLBERG (Stockholm, Sweden)
- Rôle des Glycoprotéines Sulfatées dans les Mécanismes de Protection de la Muqueuse Gastrique 429
 F. MARTIN and R. LAMBERT (Lyon, France)
- Antibody Content of Anacid Gastric Juices: The occurrence of *E. coli* Antibodies and Poliovirus Neutralizing Antibodies 435
 V. BALÁZS (Szeged, Hungary)
- Über die Isolierung und Immunchemische Charakterisierung der Antigenen Magensaftesterase VI A 441
 W. RAPP and H. E. LEHMANN (Heidelberg, Germany)
- Isolement et Caractérisation de Chondroïtine-4-Sulfate dans la Sécrétion Gastrique Fundique chez le Chien 451
 M. C. WOUSSEN-COLLE and J. DE GRAEF (Bruxelles, Belgium)

—Immunoglobulins

- Coproantibody and Defense Mechanisms of the Intestinal Mucosal Surface 459
 R. FRETER (Ann Arbor, Mich., U.S.A.)

Immunoglobulin Production and Secretion into the Intestinal Tract of Primates under the Influence of Some Antigenic Stimuli	469
O. FELSENFELD (Covington, La., U.S.A.)	
Immunoglobulin Synthesis by Tissues of the Gastro-intestinal and Respiratory Tracts	479
R. VAN FURTH and F. AJUTI (Leiden, Netherlands)	
Increased Serum IgA in Intestinal Disease	485
H. POEN, R. E. BALLIEUX, N. A. J. MUL, J. W. STOOP, O. J. TEN THIJSE and B. J. M. ZEGERS (Utrecht, Netherlands)	
Source of IgA in Jejunal Secretions	
B. P. HAZENBERG, PH. J. HOEDEMAEKER, P. NIEUWENHUIS and E. MANDEMA (Dordrecht, Netherlands)	491

— Liver and Pancreas

Protein Synthesis by the Human Exocrine Pancreas	499
J. C. KUKRAL (Chicago, Ill., U.S.A.)	
Présence d'une Protéine d'Origine Tissulaire, L' α_2 H dans le Sérum de Sujets atteints d'Affections Malignes	511
D. BUFFE, C. RIMBAUT and P. BURTIN (Villejuif, France)	
First Meconium in the Detection of Fibrocystic Disease of the Pancreas	517
J. R. HOBBS (London, Great Britain)	

B5. Genital Secretions

Muramidase (Lysozyme) in Cervical Secretions	525
G. F. B. SCHUMACHER and M. J. PEARL (Chicago, Ill., U.S.A.)	
Enzymes and Proteins in Uterine Mucus	535
H. LAMIROY (Brugge, Belgium)	
A Seminal Fluid Component used for Desensibilization of Women with Unexplained Infertility	541
Y. LEVANON and S. M. O. ROSSETINI (São Paulo, Brazil)	
The Antigens of Human Seminal Plasma (with Special Reference to Lactoferrin as a Spermatozoa-coating Antigen)	549
A. HEKMAN and P. RÜMKE (Amsterdam, Netherlands)	
Purification of the 3·72 S Protein of the Human Seminal Fluid by Fractionation on Sephadex G 200 and Preparative Agar Gel Electrophoresis	553
W. P. HERRMANN and G. HERMANN (Köln, Germany)	

B6. Urinary Proteins

"Tissue" Antigens and Enzymes in Human Urine	559
S. P. HALBERT, E. L. GREENE and CH. PALLAVICINI (Miami, Fla., U.S.A.)	
Caractérisation et Séparation du Pepsinogène Urinaire: Correlations avec la Sécrétion Gastrique	573
H. HIRSCH-MARIE (Villejuif, France)	
Polymorphisme Immunologique des Molécules de γ G Excrétées au cours de Protéinuries	585
J. P. LEBRETON, C. RIVAT, L. RIVAT and C. ROPARTZ (Bois-guillaume, France)	
Les Facteurs Gm, Inv et ISf des Urines Normales	593
L. RIVAT, C. RIVAT, J. P. LEBRETON and C. ROPARTZ (Bois-guillaume, France)	

Nachweis Elektrophoretisch Aufgetrennter Harnkolloide durch Kaliumperman- ganat	597
H. WACHTER, G. SALLABERGER, W. GÜTTER and W. RAFFEINER (Innsbruck, Austria)	
The Level of Plasma Proteins in Normal Human Urine	603
J. R. POORTMANS (Bruxelles, Belgium)	
Les Mucopolysaccharides Urinaires dans l'Epilepsie Myoclonique Progressive Familiale (types Lafora et Unverricht-Lundborg)	611
F. INFANTE and E. RALLO (Geneve, Switzerland)	
B7. Milk Proteins	
Ekkrynosiderophilin of Human Milk	619
A. L. SCHADE, C. PALLAVICINI and U. WIESMANN (Bethesda, Md., U.S.A.)	
The Role of Lactoferrin in Ion Absorption	627
P. DE LAEY, P. L. MASSON and J. F. HEREMANS (Leuven, Belgium)	
New Data on Lactoferrin. The Iron-binding Protein of Secretions	633
P. L. MASSON, J. F. HEREMANS, E. SCHONNE and P. A. CRABBÉ (Leuven, Belgium)	
The Origin of Immunoglobulin in Ruminant Milk	639
A. K. LASCELLES, D. D. S. MACKENZIE and P. M. OUTERIDGE (Camden, Australia)	
Isolement et Caractérisation de l'Auto-antigène, Responsable de la Formation d'Auto-anticorps chez les Malades Atteints de Lésions Mammaires Cancéreuses ou Non	647
F. LOISILLIER, P. BURTIN and P. GRABAR (Villejuif, France)	
Comparison of Rabbit Immunoglobulins-Colostrals IgA	659
A. VAN DALEN, H. G. SEIJEN and M. GRUBER (Groningen, Netherlands)	
Preferential Adsorption of a Single Bovine IgG Type by Isolated Epithelial Cells of the Mammary Gland	663
D. K. HAMMER, B. KICKHÖFEN and H. MALCHOW (Freiburg, Germany)	
B8. Extra-cellular Fluid Proteins	
Les Immunoglobulines Sériques IgG, IgA, IgM dans les Liquides Ascitiques de Nature Différente	669
S. FEDELI and M. G. RANIERI (Pavie, Italy)	
Extravascular Plasma Albumin in the Kidney and Its Possible Role in Urine For- mation	673
G. G. PINTER (Baltimore, Md., U.S.A.)	
Les Antigènes du Liquide Amniotique Humain	679
S. VON KLEIST, D. BUFFE and P. BURTIN (Villejuif, France)	
The Transcapillary Passage of Different Proteins in the Operative Wound	685
H. T. MOURIDSEN and K. WALLEVIK (Copenhagen, Denmark)	

SECTION C. TECHNIQUES

C1. Electro-focusing

Isoelectric Focusing of an Estradiol Binding β -Globulin Present in Human Serum	695
H. VAN BAELEN, E. SCHONNE, W. HEYNS and P. DE MOOR (Leuven, Belgium)	

Electro-focusing Studies in the Protein Hormones—Human Chorionic Gonadotrophin, Human Luteinizing Hormone and Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin P. M. MORITZ (London, Great Britain)	701
---	-----

The Subunits of Low- and High-density Lipoproteins V. BLATON and H. PEETERS (Brugge, Belgium)	707
--	-----

C2. Determination of Fractions

The Stokes Radius of Macromolecules determined from Electrophoresis in Agarose H. WALDMANN-MEYER (Lyngby, Denmark)	715
---	-----

Lipoprotein Electrophoresis on Gelatinized Cellulose Acetate B. COLFS and J. VERHEYDEN (Antwerpen, Belgium)	723
--	-----

Free Amino Acids of the Blood Plasma in Cases of Megaloblastic Anaemia S. JACOBS (London, Great Britain)	731
---	-----

The Separation and Quantitative Analysis of Gamma-aminobutyric Acid (Gaba) by One-dimensional Paper Chromatography J. C. DELHAYE and G. SCHAEFER (Bad Godesberg, Germany)	735
--	-----

Isolation of Components of Fragmented Normal Human IgG Immunoglobulin F. ŠKVAŘIL and V. BRUMMELOVÁ (Praha, Czechoslovakia)	741
---	-----

A Longitudinal Study of the Serum Ceruloplasmin, α_2 -Macroglobulin, Transferrin and Immunoglobulins IgA, IgG and IgM in Children with Scarlet Fever D. WIEDERMANNOVÁ, D. WIEDERMANN, J. F. HEREMANS and P. L. MASSON (Brno, Czechoslovakia)	747
--	-----

The Turnover in Humans of Polymerized Human Serum Albumin and of Fractions of Human Serum Albumin with Different N-F Transformation Patterns K. WALLEVIK and H. T. MOURIDSEN (Copenhagen, Denmark)	755
---	-----

Variations in Protein Synthesis Rate Demonstrated with the Fluorescent Antibody Technique R. S. LANE (London, Great Britain)	763
---	-----

INDEX	769
-------	-----

ACADEMIC LECTURE

Analyses Immunochimiques des Tissus

P. GRABAR

LA SPÉCIFICITÉ des réactions immunologiques a incité beaucoup de chercheurs, dès le début de ce siècle, à les utiliser pour comparer entre eux les constituants de divers tissus d'une même espèce ou ceux des tissus analogues de diverses espèces d'Animaux ou de Végétaux. Il serait vain d'essayer de mentionner, ne serait-ce que les principaux résultats publiés sur cette question et, dans ce qui suit, nous nous limiterons à ne citer que quelques exemples. Nous tâcherons, par contre, d'envisager certains aspects généraux qui peuvent être dégagés de nos connaissances actuelles.

Depuis longtemps déjà, deux notions fondamentales ont été mises en évidence: l'existence d'une spécificité antigénique d'espèce et d'une certaine spécificité d'organes ou de tissus différents. Cela voulait dire qu'un organe ou tissu différencié contenait des antigènes (ou tout au moins des déterminants antigéniques) particuliers et caractéristiques de cet organe ou tissu. D'autre part, on admettait que des constituants analogues existant dans les espèces différentes se distinguent par leurs structures antigéniques. Cependant, les méthodes immunologiques qui ont été utilisées dans la première moitié de ce siècle ne permettaient généralement pas de préciser ou de définir les divers constituants, sauf lorsqu'on en possédait au moins certains à l'état pur et parfois lorsqu'on arrivait à épuiser convenablement les immunsérums utilisés.

L'introduction de méthodes physico-chimiques telles que l'ultracentrifugation, l'ultrafiltration fractionnée, puis l'électrophorèse et plus récemment la chromatographie ou la filtration d'exclusion, ont fourni des moyens de séparation ou de définition de constituants présents dans un extrait de tissu. Mais très souvent, il existe des constituants dont les propriétés physico-chimiques sont tellement voisines que l'on n'arrive pas à les distinguer à l'aide de ces méthodes.

L'étude des constituants des tissus a été grandement facilitée par des méthodes immunologiques nouvelles, telles que les précipitations en milieu

gélifié, et surtout l'analyse immunoélectrophorétique (A-I.E.) qui permet de mettre en évidence et de définir des constituants de mélanges, même très complexes, par deux et souvent trois critères totalement différents, à savoir: la spécificité antigénique, la mobilité électrophorétique et les propriétés chimiques ou enzymatiques (grâce à l'emploi de colorants particuliers ou de substrats donnant des produits colorés ou colorables)⁽¹⁾. Plus récemment, ont été décrites des techniques supplémentaires qui permettent d'augmenter la sensibilité des réactions. Il s'agit d'un marquage des antigènes ou des anticorps, soit par des éléments radioactifs (cette technique a reçu le nom de «radio-immunoélectrophorèse»⁽²⁾, soit par des colorants fluorescents⁽³⁾, soit enfin par des enzymes⁽⁴⁾. Les anticorps ainsi marqués peuvent aussi être utilisés pour préciser en microscopie optique⁽⁵⁾, ou électronique⁽⁶⁾ l'endroit précis dans des cellules où se trouvent ces antigènes. Dans une certaine mesure, l'emplacement d'un antigène à l'intérieur d'une cellule peut être aussi décelé lorsqu'on étudie les sous-fractions cellulaires obtenues par des centrifugations différentielles. Notons enfin que, dans certains cas, la mise en évidence d'un effet cytotoxique d'un anticorps peut fournir des renseignements utiles.

L'inconvénient majeur des méthodes basées sur la précipitation spécifique est que l'on ne peut étudier que les antigènes solubles, tandis que l'inconvénient principal de toutes les méthodes immunologiques est la nécessité d'avoir un bon immunsérum contenant des anticorps envers le maximum possible de substances contenues dans un tissu ou des cellules données. Or, il n'est pas toujours facile d'obtenir de tels immunsérums et de ce fait, nos connaissances des constituants présents dans un tissu sont toujours limitées.

Avec les immunsérums de Lapins que nous avons pu obtenir, nous n'avons généralement pas observé plus de douze à quinze constituants dans des extraits de divers tissus, en excluant naturellement les constituants sanguins toujours présents dans ces extraits. Or, il est évident que chaque cellule doit contenir beaucoup plus de constituants distincts si l'on envisage seulement le nombre d'enzymes différents qui sont essentiels pour le métabolisme de ces cellules. Si on n'en décèle que peu, cela peut s'expliquer soit parce que les autres sont à une concentration inférieure à la sensibilité des méthodes utilisées, soit parce que l'immunsérum ne contient pas d'anticorps correspondants à ces constituants. Cette déficience pourrait s'expliquer par la faible antigénicité de certains constituants des tissus due à la similitude antigénique de ces substances avec les constituants endogènes de l'animal fournisseur d'immunsérum. Dans nos études, nous

avons souvent été obligés d'immuniser des lapins pendant de nombreux mois pour obtenir des immunosérums riches en anticorps précipitants envers des tissus de Rats, tels que la rate et le thymus, et seuls quelques uns des lapins injectés ont fourni des sérums suffisamment riches en anticorps précipitants.

Lorsqu'on veut analyser des cellules ou des tissus, on se heurte souvent à un autre aspect méthodologique, l'extraction des constituants de ce matériel. A ma connaissance, il n'existe pas de méthodes générales convenables. En effet, le but étant de connaître d'une part les constituants qui proviennent réellement de ces cellules, il faut d'abord tâcher d'éliminer toutes les contaminations possibles. D'autre part, on aimerait connaître *tous* les constituants de ces cellules, il faut donc éviter toutes pertes possibles. Enfin, il faut faire très attention à ne pas provoquer, au cours d'une extraction, de modifications ou dénaturations des constituants que l'on extrait, par exemple par l'action des protéases présentes dans l'extrait.

En ce qui concerne les contaminations, il y en a toujours et pratiquement il est extrêmement difficile de se débarrasser entièrement des constituants sanguins lorsqu'on fait des extraits de tissus. Il serait naturellement mieux, si l'on pouvait obtenir des suspensions de cellules isolées et les laver convenablement. Mais ces cas sont rares et des lavages prolongés pourraient aboutir à des pertes de constituants des cellules par extraction. Il est de toute façon nécessaire de contrôler la présence dans les extraits de constituants sanguins, ce qui est facile grâce aux méthodes immunochimiques, et d'en tenir compte.

Comme déjà mentionné, on aimerait connaître *tous* les constituants, donc éviter les pertes mais aussi arriver à solubiliser ces constituants, lorsqu'on utilise pour leur mise en évidence les méthodes de précipitation spécifique. Dans certains cas, on arrive à solubiliser des constituants insolubles dans les milieux aqueux habituels à l'aide de techniques spéciales, telles que l'emploi de solutions concentrées d'urée, de détergents ou de l'alcool butylique, etc. On peut encore envisager l'utilisation de méthodes plus drastiques, à savoir une attaque modérée par des enzymes. En effet, on peut arriver ainsi à obtenir des produits de dégradation solubles qui réagissent encore fort bien avec les anticorps⁽⁷⁾. Il faut cependant prouver ensuite que ces produits proviennent réellement d'une seule substance lorsqu'il y a apparition de plusieurs produits de dégradation.

Dans nos études sur les constituants des érythrocytes, nous avons constaté que, simplement en lyophilisant les stroma, on arrive ensuite à solubiliser jusqu'à 90% de leurs constituants⁽⁸⁾.

D'une manière assez générale, les substances peu ou pas solubles font partie des membranes cellulaires. Or, ces constituants peuvent jouer un rôle important notamment en ce qui concerne l'histocompatibilité et les cellules tumorales. L'isolement de ces substances et leur identification par les méthodes immunologiques présentent donc un intérêt considérable. Si l'on n'arrive pas à les solubiliser, on est obligé de s'adresser à des méthodes autres que la précipitation spécifique. On peut utiliser soit la fixation du complément, soit des anticorps marqués par des colorants fluorescents, des éléments radioactifs, ou des enzymes. On peut aussi observer l'effet cytotoxique en présence du complément. Or, toutes ces méthodes, tout en étant souvent utiles et plus sensibles que la précipitation spécifique, ne permettent pas de distinguer les antigènes entre eux, lorsqu'on a affaire à un mélange ce qui est presque toujours le cas. Parfois, il est possible de contourner la difficulté en effectuant des absorptions progressives et fractionnées des immunsérums de manière à obtenir un sérum mono-spécifique. Cependant, pour prouver qu'il est réellement mono-spécifique, il faudrait pouvoir effectuer des contrôles à l'aide de méthodes de précipitation spécifique et donc obtenir l'antigène en solution.

Dans de nombreuses études, et particulièrement lorsqu'on veut préciser quels sont les constituants spécifiques d'un certain tissu, on doit effectuer des absorptions de l'immunsérum afin d'éliminer les anticorps qui réagissent avec des substances qui sont présentes dans d'autres organes ou liquides de l'organisme. Lorsqu'on n'envisage que les constituants solubles, on peut se rendre compte de la présence d'antigènes communs à d'autres tissus en effectuant des A-I.E. comparées de divers tissus à l'aide du même immunsérum. On observe souvent des antigènes communs dans des tissus très différents.

Il arrive parfois que l'absorption d'un immunsérum pose des problèmes délicats. Ainsi, lorsqu'on essaye de démontrer qu'une substance est spécifique d'un certain tissu, si cette substance passe normalement dans le courant sanguin et que l'on absorbe l'immunsérum anti-tissu par du plasma, on élimine ainsi les anticorps spécifiques de cette substance. Nous avons eu un cas de ce genre lorsque nous avons étudié les constituants de la moelle osseuse du Rat. Ce n'est qu'en lavant abondamment les suspensions des cellules de la moelle et en contrôlant les lavages jusqu'à disparition de toute réaction avec un immunsérum antisérum normal total, que nous avons pu montrer que l'extrait des cellules lavées contient de la transferrine⁽⁹⁾. La présence de cette protéine est certainement normale dans des cellules parmi lesquelles on trouve des érythroblastes, mais avec un