

CHROM. 7241

UTILISATION DES GELS D'ACRYLAMIDE-AGAROSE SOUS FORME DE PERLES ET DE PLAQUES POUR LE FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES SÉRIQUES*

M. DELAY, E. BOSCHETTI et R. TIXIER

Industrie Biologique Française, 92231 Gennevilliers (France).

et

M. DUGUÉ et F. ROUSSELET

Laboratoire de Biochimie Appliquée, U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale, Université René Descartes, 75006 Paris (France)

(Reçu le 2 mai 1973)

SUMMARY

Use of acrylamide-agarose gel beads and plates in the study of serum proteins

Gel filtration on acrylamide-agarose beads Aca 34 allows the fractionation of serum proteins according to their molecular weights. The proteins contained in each fraction are analysed by electrophoresis on acrylamide-agarose plates and identified by immunoelectrophoresis. The elution diagram shows three main peaks with a plateau between the first peak and the second peak and a shoulder at the beginning of the second peak. The authors have been able to characterize β -lipoprotein and IgM in the first peak, α_2 -macroglobulin at the level of the plateau, siderophilin, ceruloplasmin and haemopexin between the second peak and the third peak, and albumin and α_1 -antitrypsin in the third peak. Orosomucoid and prealbumin are eluted last. The IgA range extends from the first peak to the second peak and the IgG are localized between the shoulder of the second peak and the third peak. The haptoglobin polymers are distributed all along the elution diagram according to their molecular weights. Gel filtration on acrylamide-agarose beads combined with electrophoresis on acrylamide-agarose plates and immunoelectrophoresis should provide a particularly convenient and efficient analytical tool for the study of pathological sera.

INTRODUCTION

Les gels d'acrylamide-agarose, préconisés par Uriel et Berges¹ et Uriel², sont utilisés depuis quelques années en électrophorèse pour l'étude des protéines, des acides nucléiques et des polysaccharides. Récemment, une séparation des protéines du sérum humain, avec identification des bandes principales, a été réalisée à l'aide de films d'acrylamide-agarose réhydratables³.

* Communication présentée au 1er Congrès international sur la Chromatographie en phase liquide sur colonnes, Interlaken, 2–4 mai 1973.

Ces gels, sous forme de granules sphériques, permettent également une excellente résolution des protéines en chromatographie d'exclusion moléculaire^{4,5}.

Dans le présent travail nous examinons les possibilités d'utilisation d'un de ces gels sous forme granulaire pour le fractionnement des protéines du sérum humain. L'analyse des fractions recueillies est effectuée par électrophorèse sur films d'acrylamide-agarose réhydratables et par immunoélectrophorèse sur gel d'agar⁶. Les supports utilisés antérieurement pour la séparation des protéines sériques sont des gels de dextran (Sephadex[®] G-200 et G-150)^{7,8} et des grains de verre poreux "Controlled Pore Glass"⁹. Seul Freeman et Smith⁸ ont effectué une analyse systématique des fractions obtenues par immunoélectrodifusion selon la technique de Laurel¹⁰.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chromatographie sur colonne de gel

Le gel utilisé contient 3% d'acrylamide et 4% d'agarose, le diamètre des granules étant compris entre 100 et 160 μm (Indubiose[®] AcA 34*).

300 ml de gel sont mis en suspension dans 2 l de solution tampon Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 et NaCl 0.5 M contenant 0.02% d'azoture de sodium; l'agitation est maintenue pendant 30 min pour éliminer les impuretés qui restent en suspension. Ce traitement est répété jusqu'à ce que le surnageant demeure limpide (en pratique deux à trois fois).

Après dégazéification sous vide, la suspension est introduite dans la colonne à chromatographier (diamètre 20 mm, hauteur 1 m) en prenant les précautions habituelles. Après sédimentation et passage d'environ 600 ml de tampon, la hauteur de la colonne de gel est de 940 mm. A la sortie la colonne est reliée à un ensemble LKB (LKB Producter, Bromma, Suède) avec collecteur de fractions et enregistrement de l'absorbance de l'éluat à 282 nm.

3.5 ml de sérum humain normal (type haptoglobine 2-1) sont concentrés à 1 ml. Le concentrat est déposé sur la surface du gel et le débit d'écoulement réduit à 4.5 ml/h par une pompe péristaltique branchée à la sortie de la colonne, l'expérience étant effectuée à 4°. Les échantillons recueillis sont de 1.3 ml. L'enregistrement de l'absorbance de l'éluat donne une idée de la teneur relative en protéine de chaque échantillon; certains de faible concentration sont réunis (Fig. 1). Chaque fraction est ensuite dialysée contre du tampon de migration d'électrophorèse dilué au 1/10, puis lyophilisée.

Électrophorèse sur plaques d'acrylamide-agarose

L'analyse électrophorétique des fractions est effectuée sur film d'acrylamide-agarose (Indubiose[®] Plates**) selon la technique d'Uriel² modifiée³. Chaque fraction lyophilisée est dissoute dans le volume d'eau distillée nécessaire pour obtenir une concentration finale en protéine comprise entre 4 et 8 mg/ml. L'électrophorèse

* Indubiose[®] AcA 34 est un produit de l'Industrie Biologique Française, 92231 Gennevilliers, France. Distributeur pour la France: Sofranie, 2, rue Pocard prolongée, 92300 Levallois-Perret, France.

** Indubiose[®] Plates sont un produit de l'Industrie Biologique Française, 92231 Gennevilliers, France. Distributeur pour la France: Sebia, 3, Bd. Exelmans, 75016 Paris, France.

est effectuée à 4° sous une tension de 10 V/cm, le temps de migration se situant entre 150 et 180 min.

Les électrophorégrammes sont finalement colorés au Coomassie Brillant Blue R (E. Gurr, Londres, Grande-Bretagne) et conservés après déshydratation sous feuilles de cellophane.

Immunoélectrophorèse

Les immunoélectrophorèses sont effectuées sur Agar Noble Difco selon la technique de Grabar et Williams⁶. L'immunsérum polyvalent utilisé pour la révélation provient de l'Institut Pasteur (lot No. 742), les immunsérums spécifiques des Laboratoires Hoechst (Paris, France), Hyland (Versailles, France) et Biotrol (Paris, France). Les images obtenues avec l'immunsérum polyvalent sont colorées à l'Amido-Schwartz (Merck, Darmstadt, R.F.A.) et celles observées avec les immunsérums spécifiques au Rouge Ponceau S (R.A.L., Clichy, France).

RÉSULTATS

Chromatographie sur colonne de gel

La Fig. 1 montre la courbe d'élution du sérum humain normal. Celle-ci est constituée de trois pics principaux, d'un plateau entre le premier et le deuxième pic et d'un épaulement au début du deuxième pic. Le gel jouant le rôle d'un tamis moléculaire, les macromolécules sortent en premier; les autres protéines sont d'autant plus retardées que leur poids moléculaire est plus faible. Comme le montre la Fig. 1 nous avons analysé 26 fractions, les protéines de chaque fraction étant identifiées dans la mesure de nos possibilités par électrophorèse et immunoélectrophorèse à l'aide d'un immunsérum polyvalent puis d'immunsérums spécifiques.

Pour simplifier l'exposé nous ne parlerons que des fractions les plus significatives, l'ensemble des résultats ayant cependant servi pour établir la Fig. 5.

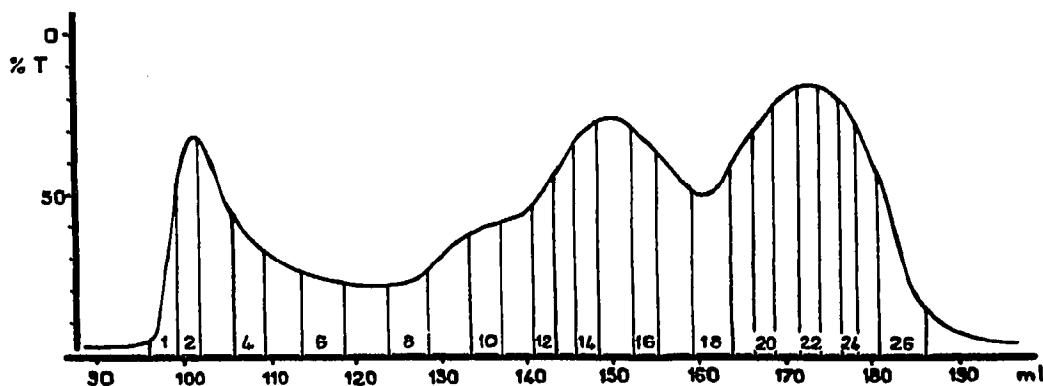


Fig. 1. Courbe d'élution du sérum humain normal et subdivision en 26 fractions. Dimensions de la colonne, 20 × 940 mm; débit, 4.5 ml/h; tampon, Tris-HCl 0.5 M + NaCl 0.1 M + NaN₃ 0.02%, pH 7.4. T = Transmission.

Électrophorèse sur plaques d'acrylamide-agarose

L'ensemble des électrophorèses représentées sur la Fig. 2 met en évidence l'influence du poids moléculaire sur la mobilité de la protéine à travers le gel AcA; la distance de migration est d'autant plus grande que la masse moléculaire est faible. Les macromolécules (IgM et β -lipoprotéine), contenues dans les trois premières fractions, ne pénètrent pas dans le gel et restent dans le réservoir de départ. L' α_2 -macroglobuline est mise en évidence dans la fraction 4. A partir de la fraction 7 apparaissent les immunoglobulines (IgA puis IgG) et les haptoglobulines; l' α_2 -macroglobuline a disparu. La sidérophiline et la céruléoplasmine font leur apparition dans la fraction 12; les haptoglobulines s'enrichissent de plus en plus en fractions légères et s'appauvrissent en fractions lourdes. Les IgA, très visibles dans les fractions de 10 à 12, diminuent ensuite, tandis que les IgG augmentent dans les fractions suivantes de 12 à 17 et sont à peine décelables dans la fraction 20.

L'albumine, qui apparaît faiblement dans la fraction 12, devient de plus en plus abondante dans les fractions suivantes. L'orosomucoïde, l' α_1 -antitrypsine et la préalbumine se retrouvent dans les dernières fractions de 23 à 26. D'autres protéines de mobilité comprise entre celle de la sidérophiline et celle de l'albumine n'ont pu être identifiées; elles appartiennent probablement aux α -globulines (Gc-globuline, α_2 -HS-glycoprotéine, Zn- α_2 -glycoprotéine, etc.).

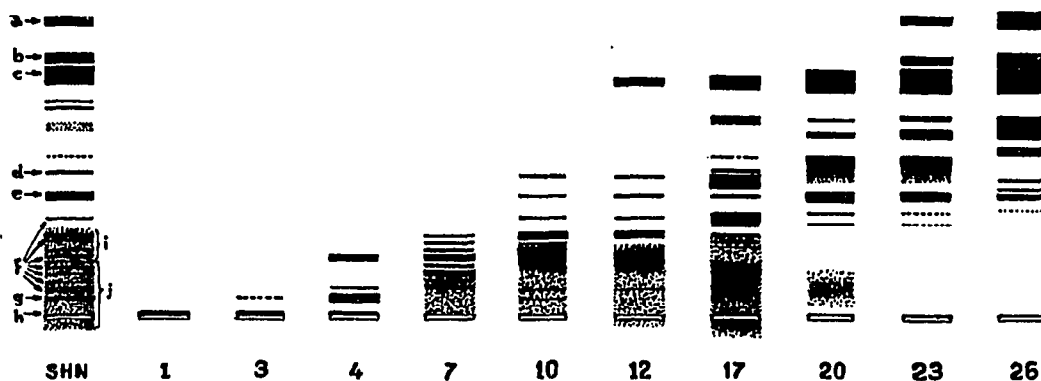


Fig. 2. Électrophorèses sur gel d'acrylamide-agarose des fractions obtenues par chromatographie. SHN=Sérum humain normal. a=Préalbumine; b= α_1 -antitrypsine; c=albumine + orosomucoïde; d=céruléoplasmine + haptoglobines; e=sidérophiline; f=haptoglobines; g= α_2 -macroglobuline; h=IgM + β -lipoprotéine; i=IgA; j=IgG.

Immunoélectrophorèse

L'analyse immunoélectrophorétique des fractions sériques est effectuée en même temps que celle d'un sérum humain normal afin de rendre plus facile l'interprétation des arcs de précipitation. Chacun des arcs obtenus avec l'immunsérum polyvalent est ensuite identifié, dans la mesure de nos possibilités, avec un immunsérum spécifique.

Sur les Fig. 3 et 4 sont représentées les immunoélectrophorèses des fractions qui semblent les plus intéressantes pour suivre le comportement chromatographique des différentes protéines.

L'immunoélectrophorèse de la fraction 3 qui correspond au premier pic (Fig. 1) montre la présence de l'arc de précipitation des immunoglobulines M. Le précipité visible autour du réservoir de départ est probablement dû à la présence de la β -lipoprotéine.

La fraction 6 donne trois arcs de précipitation qui sont identifiés comme étant ceux des IgA, de l'haptoglobine et de l' α_2 -macroglobuline. La faible teneur en IgA de cette fraction explique la faible intensité et la dimension réduite de l'arc.

Les arcs donnés par la fraction 7 montrent l'apparition de l' α -lipoprotéine, la diminution de l' α_2 -macroglobuline, la présence d'haptoglobine et l'augmentation des IgA; les IgG, qui sont en très faible concentration, donnent un arc à peine visible.

L'immunoélectrophorèse de la fraction 10 décèle une augmentation importante des IgA et à un moindre degré des IgG. Il apparaît que l'épaulement qui précède le second pic est constitué principalement par les IgA.

Dans la fraction 12, l'arc des IgG s'intensifie et celui des IgA diminue. La sidérophiline et la céruléoplasmine deviennent décelables. Les fractions 14 et 17,

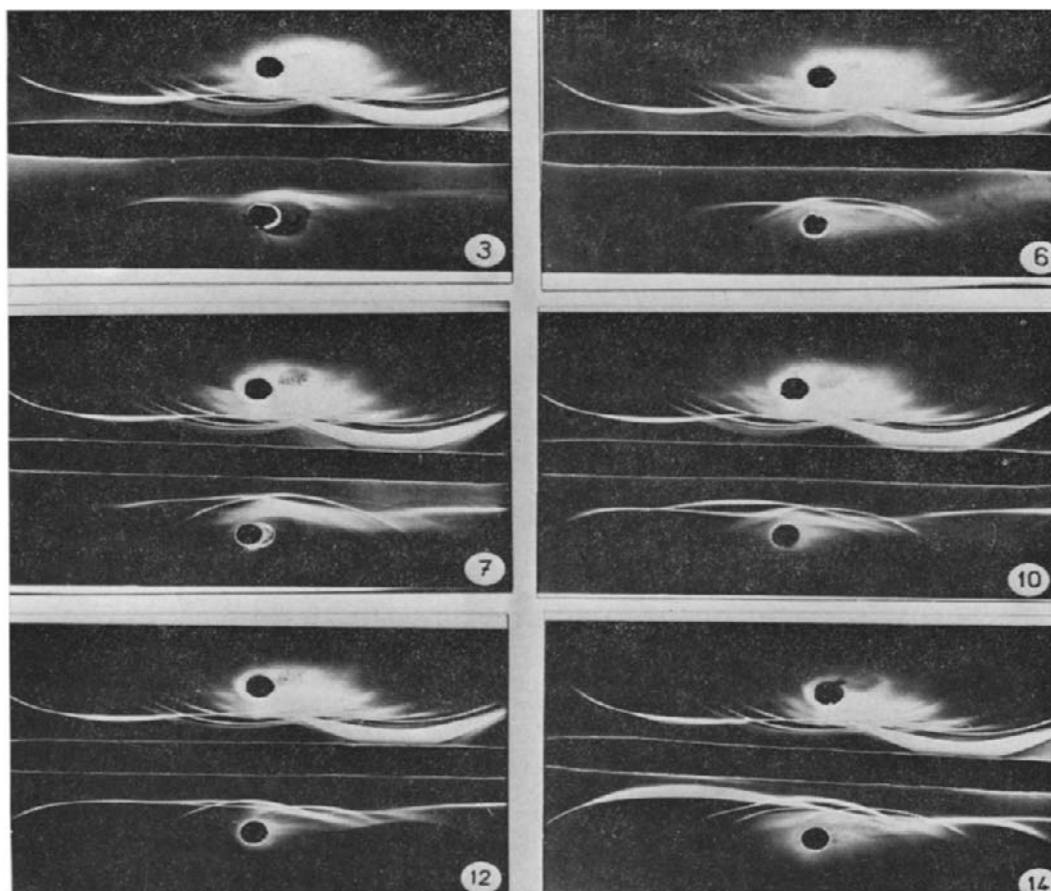


Fig. 3. Immunoélectrophorèses sur gel d'agar des fractions obtenues par chromatographie.

qui correspondent au maximum du deuxième pic, montrent une quantité très importante d'IgG, une diminution presque totale des IgA, une augmentation de la sidérophiline et de la céruléoplasmine et l'apparition de l'albumine.

Dans la fraction 20, qui correspond à la formation du troisième pic, l'albumine apparaît comme étant la protéine la plus importante; l'arc des IgG est très faible, les arcs de la sidérophiline et de l'hémopexine sont nets; l' α_1 -antitrypsine devient décelable. La fraction 23, qui correspond à la diminution du troisième pic, montre un affaiblissement des arcs de l'albumine, de la sidérophiline et des α -glycoprotéines et une augmentation de l' α_1 -antitrypsine; l'orosomucoïde, caché par l'arc de l'albumine, est mis en évidence par l'immunsérum spécifique.

La fraction 26, la moins riche en protéines, car elle représente la fin du graphique d'élution, montre quatre arcs de précipitation identifiés à l'hémopexine, à l' α_1 -antitrypsine, à l'albumine en très faible concentration et à l'orosomucoïde; un cinquième arc situé entre l'hémopexine et l' α_1 -antitrypsine n'a pu être identifié. La préalbumine, mise en évidence depuis la fraction 23 avec l'immunsérum spécifique, n'apparaît pas sur les immunoélectrophorèses avec l'immunsérum polyvalent en raison de la faible réactivité de ce dernier vis-à-vis de cette protéine.

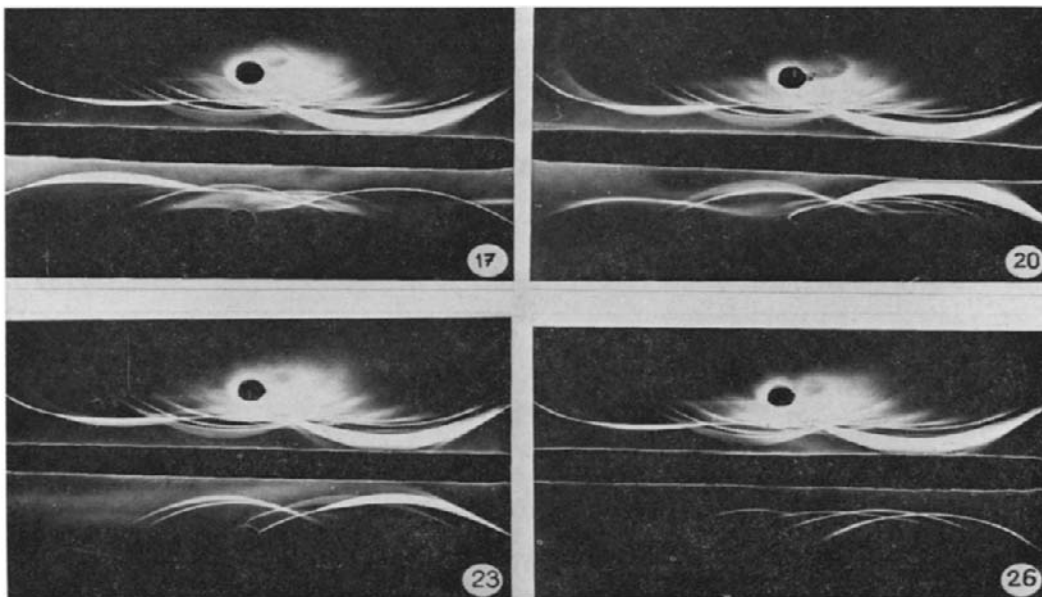


Fig. 4. Immunoélectrophorèse sur gel d'agar des fractions obtenues par chromatographie.

Il nous semble intéressant de présenter les immunoélectrophorèses spécifiques de l'haptoglobine, obtenues avec les diverses fractions, car elles mettent en évidence l'hétérogénéité de cette protéine (Fig. 5). En effet, l'arc de précipitation, bien que toujours aussi net de la fraction 6 à la fraction 17, voit sa position varier par rapport au point de départ. Dans la fraction 6, l'arc s'étend vers les deux pôles puis se déplace ensuite progressivement vers le pôle positif. Cette hétérogénéité a également été mise en évidence lors de l'électrophorèse sur gel d'acrylamide-agarose. La comparaison des résultats obtenus avec les deux techniques montre un parallélisme

entre la mobilité électrophorétique et le déplacement des arcs vers le pôle positif. Les polymères les plus légers sont ceux qui migrent le plus et qui ont leurs arcs de précipitation le plus déplacé vers le pôle positif.

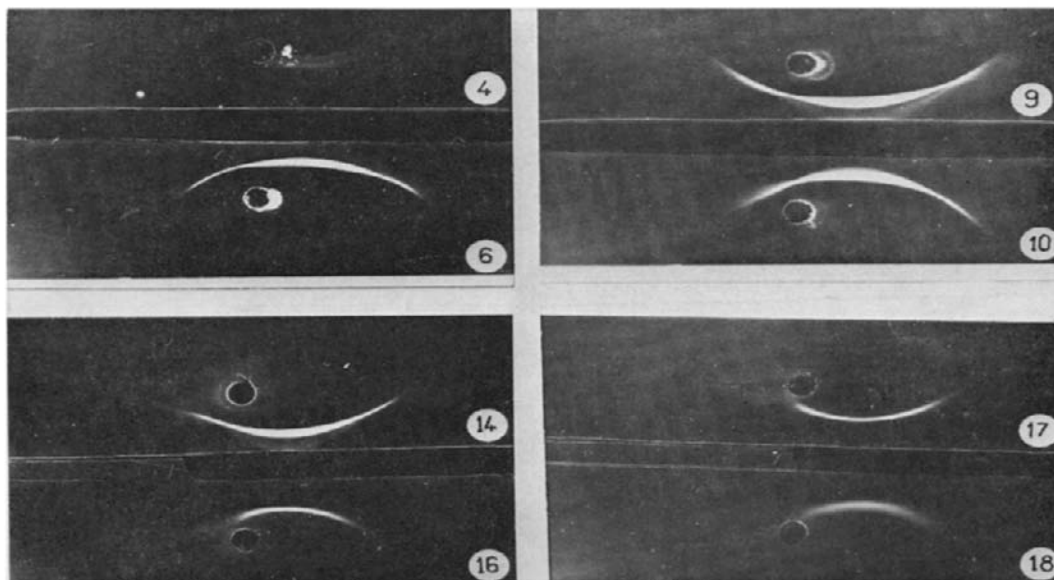


Fig. 5. Immunoélectrophorèses spécifiques sur gel d'agar révélées par sérum anti-haptoglobine

La Fig. 6 présente le profil d'élution du sérum humain normal et donne la correspondance entre les pics et les protéines retrouvées dans les différentes fractions.

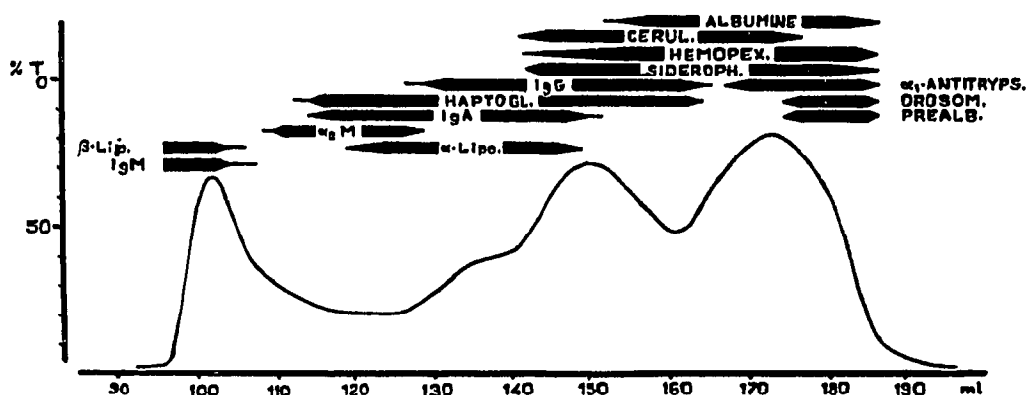


Fig. 6. Courbe d'élution du sérum humain normal et distribution entre les pics des protéines identifiées.

CONCLUSION

La chromatographie d'exclusion moléculaire sur gels d'acrylamide-agarose sous forme granulaire introduit une nouvelle technique d'étude des protéines

sériques. Dans le présent travail, nous exposons les résultats obtenus avec un sérum humain normal, nous réservant de présenter ultérieurement ceux donnés par des sérums pathologiques. Le profil d'élution de la Fig. 1 est caractéristique d'un sérum normal passé sur gel AcA 34. Le premier pic (Fig. 6) est constitué par les macromolécules (IgM et β -lipoprotéine), suivies de l' α_2 -macroglobuline. L'épaulement du deuxième pic renferme principalement des IgA, de l' α -lipoprotéine, des polymères d'haptoglobine de poids moléculaire élevé et un peu d'IgG. Le deuxième pic est constitué en majorité des IgG et des polymères d'haptoglobine de poids moléculaire plus faible. Le pic 3 contient la plus grande partie de l'albumine. La céruléoplasmine, la sidérophiline et l'hémopexine sont réparties entre les pics 2 et 3. L' α_1 -antitrypsine, l'orosomucoïde et la préalbumine sortent en dernier.

En raison de leur hétérogénéité les haptoglobines se retrouvent dans la plupart des fractions, les polymères les plus lourds sortant en premier et les plus légers ensuite. Les protéines, présentes en plus grande quantité, comme les IgA, IgG et albumine, sont décelées dans des fractions éloignées de leur maximum respectif. Il est bien évident qu'un simple passage sur une seule qualité de gel d'un liquide biologique aussi complexe que le sérum ne peut permettre une séparation très poussée et qu'il faudrait recueillir des fractions de poids moléculaire voisin pour les séparer ensuite sur des gels de qualité appropriée, par exemple: gel d'acrylamide-agarose AcA 22 pour les macromolécules et AcA 44 ou 54 pour les protéines de poids moléculaire plus faible.

Outre leur facilité d'emploi, les gels d'acrylamide-agarose présentent divers avantages. Le débit peut être réglé à la vitesse désirée; il est régulier car aucun phénomène de tassement ne se produit et la même colonne peut être réutilisée. Par ailleurs les excellentes résolutions, obtenues avec ces gels, devraient permettre des séparations plus nettes que celles observées avec un milieu aussi complexe que le sérum total, en particulier après fractionnement préalable des protéines sériques selon les techniques habituelles.

Les deux techniques d'analyse (électrophorèse sur gel acrylamide-agarose et immunoélectrophorèse) ont donné des résultats comparables. L'électrophorèse permet de suivre aisément l'évolution de la chromatographie et de mettre en évidence les polymères d'une protéine donnée, par exemple ceux de l'haptoglobine dans le cas d'un sérum normal. Jointe à l'immunoélectrophorèse, elle devrait être d'un grand intérêt pour l'étude des fractions de sérums pathologiques, obtenues après passage sur gel AcA 34.

RÉSUMÉ

La gel-filtration sur perles d'acrylamide-agarose AcA 34 permet de fractionner les protéines sériques en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines contenues dans chaque fraction sont mises en évidence par électrophorèse sur plaques d'acrylamide-agarose et identifiées par immunoélectrophorèse. Le diagramme d'élution montre trois pics principaux ainsi qu'un plateau entre le premier et le deuxième pic. Les auteurs ont pu caractériser la β -lipoprotéine et l'IgM dans le premier pic, l' α_2 -macroglobuline au niveau du plateau, la sidérophiline, la céruléoplasmine et l'hémopexine entre le deuxième et le troisième pic et l'albumine et l' α_1 -antitrypsine dans le troisième pic. L'orosomucoïde et la préalbumine sortent en dernier. La

zone des IgA s'étend du premier au second pic et celle des IgG depuis l'épaulement jusqu'au troisième pic. Les polymères des haptoglobines se distribuent tout au long du diagramme en fonction de leur poids moléculaire. La gel-filtration sur perles d'acrylamide-agarose, suivie de l'électrophorèse sur plaques d'acrylamide-agarose et de l'immunoélectrophorèse, devrait permettre un examen détaillé des sérums pathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Uriel et J. Berges, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 262 (1966) 164.
- 2 J. Uriel, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 969.
- 3 M. Dugué, E. Boschetti, R. Tixier, F. Rousselet et M. L. Girard, *Clin. Chim. Acta*, 40 (1972) 301.
- 4 E. Boschetti, R. Tixier et J. Uriel, *Biochimie*, 54 (1972) 439.
- 5 R. Tixier, E. Boschetti et J. Uriel, *Symp. Chromatogr. Électrophor.*, VIIe, Bruxelles, 1972, Presses Académiques Européennes, 1973, p. 107.
- 6 P. Grabar et C. A. Williams, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- 7 P. Flodin et J. Killander, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 403.
- 8 T. Freeman et J. Smith, *Biochem. J.*, 118 (1970) 869.
- 9 W. Haller, K. D. Typner et K. Hanning, *Anal. Biochem.*, 35 (1970) 23.
- 10 C. B. Laurel, *Anal. Biochem.*, 10 (1965) 358.