

*Journal of Chromatography*, 273 (1983) 289–299

*Biomedical Applications*

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1566

## POSSIBILITÉS D'ÉTUDE DES VARIANTES DE LA CHOLINESTÉRASE PLASMATIQUE HUMAINE PAR ÉLECTROPHORÈSE D'AFFINITÉ

PATRICK MASSON\* et PHILIPPE VALLIN

*Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Division de Chimie et Pharmacologie, 108 boulevard Pinel, 69275 Lyon Cedex 03 (France)*

(Reçu le 20 septembre 1982)

---

### SUMMARY

#### *Possibilities of study of the human plasma cholinesterase variants by affinity electrophoresis*

Affinity electrophoresis has been applied to the study of the multiple molecular forms of three human plasma cholinesterase phenotypes (usual enzyme U, atypical enzyme A and intermediate UA). Electrophoreses were carried out in polyacrylamide gels containing a water-soluble macromolecular derivative of *m*-amino-(substituted)-phenyltrimethylammonium immobilized within the gel network.

Apparent dissociation constants ( $K_{D \text{ app}}$ ) were estimated from the mobilities of the enzymes versus ligand concentration.

The ratio of  $K_{D \text{ app}}$  values of the molecular forms of phenotypes A and U which is approximately 2 is consistent with the hypothesis that the anionic site is altered in atypical enzyme.

---

### INTRODUCTION

La biosynthèse de la cholinestérase (E.C. 3.1.1.8) du plasma humain est contrôlée par plusieurs loci indépendants, Deux d'entre eux,  $E_1$  et  $E_2$  ont été identifiés. Le premier présente un polymorphisme très étendu et comporte au moins 8 allèles, le plus fréquent étant le gène "usuel"  $E_1^a$  (96%) [1]. Le second s'exprime avec une fréquence de l'ordre de 10% dans les populations caucasoïdes et produit une enzyme de faible mobilité électrophorétique, le composé  $C_5$  [2]. Parmi les allèles de  $E_1$ , le gène  $E_1^a$  code pour l'enzyme "atypique" impliquée dans la majorité des accidents d'hypersensibilité à la succinylcholine, myorelaxant d'action brève. Environ un individu sur 2000 est homozygote pour  $E_1^a$  et développera une apnée prolongée après injection de ce curarisant [3].

La nature des différences structurales entre le phénotype U ( $E_1^u E_1^u$ ) et le phénotype A ( $E_1^a E_1^a$ ) n'est pas encore connue de façon précise. Cependant, sur la base d'arguments cinétiques [4-8], de la chromatographie d'affinité [9] et de l'électrophorèse des fragments de digestion tryptique des deux enzymes marquées au [3- $^{14}C$ ]diisopropylfluorophosphate [10], il apparaît que la différence se situe au niveau du sous-site anionique du centre actif. Selon l'hypothèse de Kalow et Davies [4], la mutation ne concernerait qu'un seul aminoacide de ce site et correspondrait à la substitution d'un aminoacide dicarboxylique par un aminoacide neutre ou basique.

Nous avons émis l'hypothèse qu'il devait être possible d'étudier le site anionique des allozymes du locus  $E_1$  par électrophorèse d'affinité en opérant avec des ligands spécifiques immobilisés dans un support de polyacrylamide.

Un travail préliminaire nous a permis d'analyser le comportement des formes moléculaires  $C_1$  (monomère),  $C_2$  (dimère) et  $C_4$  (tétramère) de l'allozyme U et de déterminer leur domaine d'affinité pour un ligand, copolymère linéaire de l'acrylamide et d'un dérivé du *p*-aminophényltriméthylammonium (*p*-APTMA), emprisonné dans les mailles du gel [11].

Le présent article expose les premiers résultats que nous avons obtenus avec les phénotypes U, A et UA ( $E_1^u E_1^a$ ) et l'isomère *mé*ta du ligand cationique précédent.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Origine des plasmas et de la cholinestérase purifiée*

Les plasmas sur lesquels nous avons pratiqué nos essais provenaient d'une collection, conservée à  $-30^\circ C$ , constituée lors d'une étude portant sur la population des donneurs de sang de la région lyonnaise [12] et de sujets  $E_1^a E_1^a$  ayant développé une paralysie des muscles respiratoires à la suite d'une injection de succinylcholine.

L'allozyme U ( $E_1^u E_1^u$ ) a été purifié à partir de sang périmé fourni par le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lyon-Beynost selon la méthode antérieurement décrite [13].

L'identité des phénotypes a été reconfirmée par la détermination des nombres de dibucaïne [14] et de fluorure [15].

### *Synthèse du ligand et formation du copolymère*

À 11.82 mmoles de chlorhydrate de *m*-*N,N*-diméthyl-phénylènediamine (Merck) en solution dans 40 ml d'hexaméthylphosphotriamide, nous avons ajouté 2 ml de pyridine, puis lentement 12.3 mmoles de chlorure d'acide acrylique sous agitation. Après 12 h de réaction, le *m*-*N*-acryl-(*N,N*-diméthyl)-phénylènediamine a été isolé par précipitation dans la soude à 5%, puis méthylé sous reflux d'acétone avec un excès d'iodure de méthyle pendant 45 min. L'iodure de *m*-*N'*-acryl-(*N,N,N*-triméthylammonium)phénylènediamine précipitant pendant la réaction a été récupéré par filtration puis lavé à l'acétone froid (rendement: 46%). Sa structure a été confirmée par spectrographie infrarouge et de NMR. Son spectre ultraviolet en solution aqueuse présente un maximum d'absorption à 262 nm ( $\epsilon = 12,000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ).

La copolymérisation de cette molécule avec l'acrylamide a été effectuée

par voie radicalaire en milieu aqueux saturé d'azote dans les conditions opératoires définies antérieurement pour l'isomère *para* [11]. Sa concentration analytique dans le copolymère dialysé déterminée par spectrographie ( $\lambda_{\max} = 244 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 12,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) était de 7 mM.

### Électrophorèse d'affinité

Les électrophorèses d'affinité ont été effectuées en tube (8.5 cm  $\times$  0.5 cm I.D.) avec des gels de polyacrylamide de séparation ( $T = 6\%$ ,  $C = 3.44\%$ ; pour une définition de  $T$  et  $C$  voir réf. 30) dans lesquels le copolymère linéaire ligand-acrylamide a été incorporé en concentrations différentes au moment de la polymérisation [11]. Nous avons opéré à 4°C dans une cuve Uniscil UE4 avec des galeries de 12 tubes dans lesquels la concentration analytique en ligand variait entre 0.0175 mM et 1.40 mM. Les migrations se sont déroulées dans un tampon de circulation 0.041 M Tris-glycine (pH 8.4) sous une intensité de 3 mA/gel et ont été poursuivies pendant 90 min.

Les zones d'activité cholinestérasique correspondant aux formes moléculaires  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$  de l'enzyme ont été révélées selon la méthode de Juul [16] arrêtée à la formation de complexes blancs insolubles entre la thiocholine, produit d'hydrolyse de l'iodure de butyrylthiocholine et les ions cuivriques présents dans le tampon. Les distances de migrations ont été mesurées par densitométrie des gels sur un appareil Vernon PHI 4 (filtre Wratten No. 47 B) après 5 min d'incubation à 37°C pour la forme  $C_4$  et après 90 min pour les trois autres formes d'activité plus faible. Les mobilités relatives ( $R_{mi}$ ) ont été déterminées par rapport au colorant traceur (Bleu de Bromophénol); portées en fonction de la concentration en ligand ( $L$ ), elles nous ont permis d'estimer les constantes de dissociation apparentes ( $K_{D \text{ app}}$ ) des complexes enzyme-ligand à partir de l'équation 1 [17].

$$\frac{1}{R_{mi}} = \frac{1}{R_{m0}} \cdot \left( 1 + \frac{[L]}{K_{D \text{ app}}} \right) \quad (1)$$

dans laquelle  $R_{m0}$  représente la mobilité relative en l'absence de ligand. Les estérases ont été détectées selon la méthode de Markert et Hunter [18] en utilisant le  $\beta$ -naphthylacétate comme substrat et le Fast Violet B Salt comme diazonium de couplage. Après fixation de la coloration par immersion pendant 30 min dans un mélange éthanol-acide acétique (3:2), les gels ont été transférés dans une solution d'acide acétique à 10%. Les distances de migration et les intensités relatives de ces enzymes ainsi que celles des protéines visibles (zones opalescentes) après précipitation par le mélange dénaturant précédent ont été mesurées par densitométrie (filtre Wratten No. 47 B). Les protéines ont, par ailleurs, été révélées par coloration au Bleu de Coomassie.

### Électrophorèse en l'absence de ligand

Les électrophorèses en l'absence de ligand ( $L = 0$ ) ont été effectuées dans des gels de séparation de concentration  $T = 6\%$  dans des conditions identiques aux précédentes. Des pré-électrophorèses de ce type nous ont permis d'isoler séparément les quatre formes moléculaires de la cholinestérase après tronçonnage des zones de gel les renfermant [11].

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Allozyme U purifié*

Le comportement des trois formes moléculaires  $C_1$ ,  $C_3$  et  $C_4$  présentes dans la préparation de cholinestérase (allozyme U) vis-à-vis du ligand immobilisé {poly[*m*-A(N-acryl)-PTMA-acrylamide]} est identique à celui que nous avons observé avec l'isomère *para* de ce ligand [11]. Pour chaque espèce moléculaire, dans le domaine d'affinité qui lui est propre, au-delà d'une concentration en ligand nommée concentration de transition, il apparaît une seconde zone, B, qui s'intensifie rapidement aux dépens de la première, A, lorsque  $L$  continue de croître. Nous avons interprété ce phénomène comme le résultat d'une isomérisation des sites anioniques de l'enzyme induite par le ligand entraînant une augmentation de leur affinité ( $K_{D,B} < K_{D,A}$ ) [11]. Par ailleurs, les valeurs des constantes de dissociation apparentes (Tableau I) sont de l'ordre de grandeur de celles qui ont été obtenues avec le précédent ligand (ref. 11, Tableau I). L'affinité pour le dérivé *mé*ta apparaît cependant légèrement plus forte, confirmant ainsi les données cinétiques et chromatographiques de Picard [19] avec la même enzyme ainsi que celles de plusieurs auteurs [20-22] avec des acétylcholinestérases de différentes sources.

TABLEAU I

VALEURS DES CONSTANTES DE DISSOCIATION APPARENTES ( $K_{D,app} \cdot 10^4 M$ ) DES COMPLEXES FORMÉS ENTRE LE POLY [*m*-A(N-ACRYL)PTMA-ACRYLAMIDE] ET LES FORMES MOLÉCULAIRES DES PHÉNOTYPES U, UA ET A DE LA CHOLINESTÉRASE DU PLASMA HUMAIN

		Allozyme U purifiée par chromatographie	Formes moléculaires non purifiées (plasma)			Formes moléculaires purifiées par pré-électrophorèse		
			U	UA	A	U	UA	A
$C_1$	A	1.28 ± 0.32	1.32	1.48	2.33	1.00	1.39	1.51
	B	0.31 ± 0.10	0.29	0.41	0.56			
$C_2$	A	*	***	***	***	0.118	§§	0.214
	B							
$C_3$	A	0.189 ± 0.072				0.308	§§	0.687
	B	**	***	***	***			
$C_4$	A	0.098 ± 0.015	§	§	§	0.108	§§	0.192
	B	0.023 ± 0.003						

\* La forme  $C_2$ , dimère constitué d'une sous-unité  $C_1$ , associée à une sous-unité non enzymatique de plus petite taille [24] n'est pas copurifiée avec les trois isomères de taille.

\*\* Confondue avec  $C_4$ .

\*\*\* Déterminations impossibles en raison du chevauchement de  $C_2$  et  $C_3$ .

§ Résultats aléatoires par suite de la compétition de protéines parasites.

§§ Valeurs fluctuant entre U et A.

### *Étude directe des formes moléculaires des trois phénotypes dans les échantillons de plasma*

L'étude de la mobilité des quatre formes moléculaires de la cholinestérase

dans des plasmas de phénotype U, UA ou A, en fonction de la concentration en ligand, n'a fourni des données immédiatement interprétables que pour les formes  $C_1$ . Pour les phénotypes U et A, le rapport des constantes de dissociation apparentes ( $K_{D \text{ app, A}}$ ) des complexes  $C_1$ -ligand est voisin de 2. Dans le cas du phénotype UA, en théorie, deux zones  $C_1$ , l'une de type U, l'autre de type A, devraient se séparer lorsque  $L$  augmente. Cependant, la faible différence d'affinité apparente entre les deux enzymes, objectivée par le rapport des  $K_D$ , ne permet pas leur résolution dans nos conditions expérimentales. Aussi, la forme  $C_1$  de ce phénotype migre avec une mobilité intermédiaire entre U et A (Tableau I).

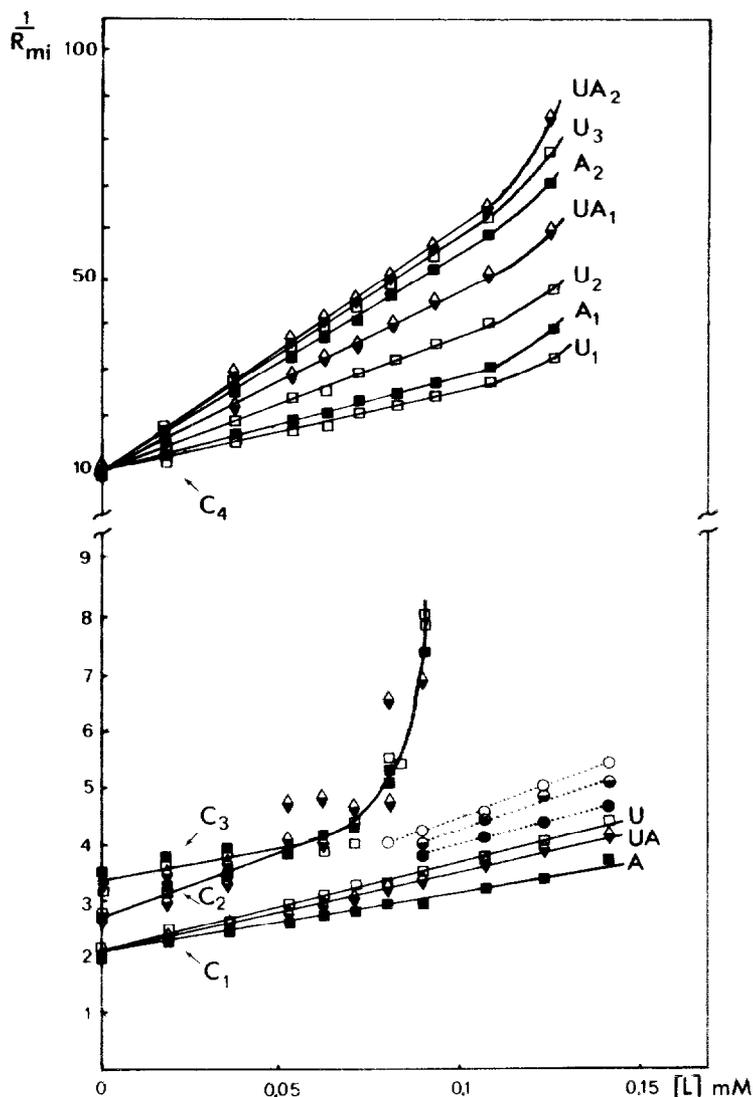


Fig. 1. Variation de  $R_{mi}^{-1}$  en fonction de  $L$  pour les quatre formes moléculaires ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ) des phénotypes U, UA et A dans différents plasmas. ■, phénotype A; ◆, phénotype UA; □, phénotype U. En pointillé, les formes  $C_i$  dans l'état B (●, phénotype A; ○, phénotype UA; ○, phénotype U).

Les valeurs des  $K_{D\text{app}}$  pour les formes  $C_2$  et  $C_3$  n'ont pu être calculées. En effet, l'affinité de  $C_2$  pour le ligand, supérieure à celle de  $C_3$ , entraîne rapidement, lorsque  $L$  croît, le chevauchement de ces deux formes (Fig. 1).

Les résultats concernant les formes  $C_4$  n'ont, par ailleurs, pu être pris en considération, en raison de leur caractère aléatoire (Fig. 1). Une analyse de variance pratiquée sur les pentes des droites représentant la variation de  $R_{mi}^{-1}$  en fonction de  $L$  a confirmé que ces pentes ne diffèrent pas de façon significative dans leur ensemble. Leur variabilité à l'intérieur d'un même phénotype est en effet supérieure à la dispersion factorielle liée aux différences d'affinité entre les trois phénotypes. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette variabilité était inhérente à la nature de la technique et résultait de la fixation aspécifique de protéines sur le ligand immobilisé. Cette hypothèse a été vérifiée en deux temps.

Nous avons tout d'abord déterminé l'influence de la quantité de protéines dans l'échantillon sur la mobilité de la forme  $C_4$  d'un plasma quelconque à concentration nulle en ligand et en parallèle à concentration élevée ( $L = 1.80 \cdot 10^{-4}$ ). Dans les gels témoins ( $L = 0$ ), l'inverse de la mobilité de  $C_4$  ( $R_{m0}^{-1}$ ) est indépendante de la quantité de protéines déposées, par contre, dans les gels d'affinité, elle décroît rapidement lorsque  $[P]$  augmente et tend vers  $R_{m0}^{-1}$  (Fig. 2). Corrélativement, on note après coloration au Bleu de Coomassie ou

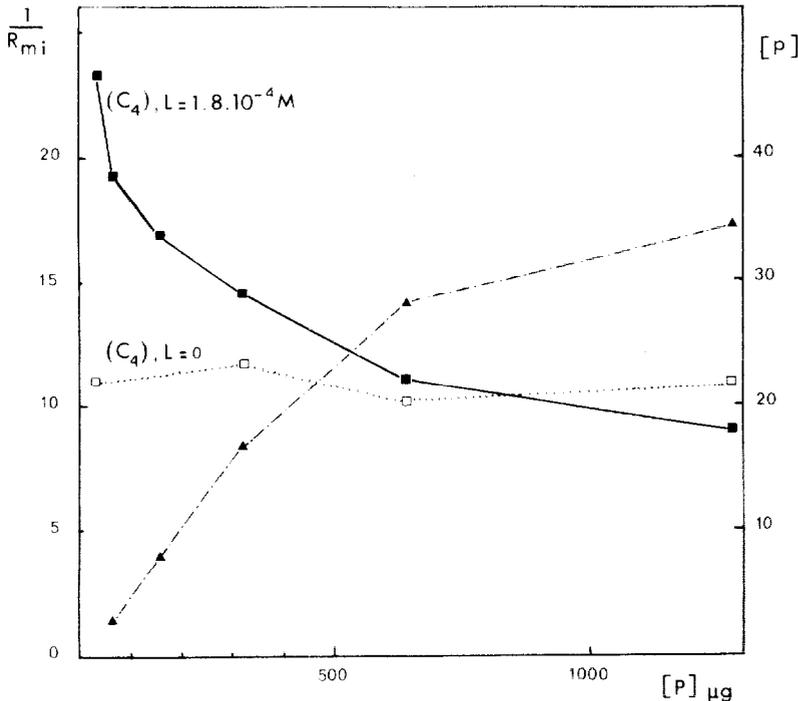


Fig. 2. Étude de la variation de  $R_{mi}^{-1}$  de la forme  $C_4$  en fonction de la quantité de protéines plasmatiques  $[P]$  dans l'échantillon. En trait plein ( $L = 1.80 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) et en pointillé ( $L = 0$ ). La courbe en tirets ( $\blacktriangle$ ) représente la quantité de protéines  $[p]$  arrêtées au sommet des gels de séparation en fonction de  $[P]$  lorsque  $L = 1.80 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  (les concentrations  $[p]$  déterminées par densitométrie des gels sont exprimées en unités arbitraires).

précipitation par le mélange éthanol—acide acétique, la présence en quantité progressivement croissante de protéines [ $p$ ] arrêtées à l'entrée des gels de séparation. Aucune activité arylestérasique n'est détectée à ce niveau.

Dans un second temps, nous avons cherché à apprécier l'importance des variations qualitatives entre les plasmas. Nous avons opéré avec des plasmas de phénotype U, UA ou A ayant la même concentration en protéines. Pour chacun d'eux, des dépôts de 10  $\mu$ l/gel (environ 600  $\mu$ g) ont été effectués et les électrophorèses à  $T = 8\%$  pratiquées respectivement en l'absence et en présence de ligand ( $L = 1.80 \cdot 10^{-4}$ ). Après migration, les gels de séparation ont été sectionnés à leur partie supérieure sur une hauteur de 2 mm. Les tronçons isolés ont été ensuite soumis à des électrophorèses à  $T = 6\%$  et  $L = 0$ . Pour les tronçons issus des gels contenant le ligand, les zones protéiques révélées après coloration au Bleu de Coomassie se répartissent à tous les niveaux des gels; leur nombre, leur position ( $R_m$ ) et leur intensité variant d'un échantillon à l'autre.

Donc, ces protéines dont la concentration est toujours très supérieure à celle de la cholinestérase (5–10 mg/l), non détectée par la coloration au Bleu de Coomassie, varient qualitativement et quantitativement d'un plasma à l'autre. En raison du manque de spécificité du ligand et/ou du fonctionnement de la matrice comme un échangeur d'anions, elles se fixent au sommet des gels d'affinité et occupent les résidus ligands disponibles sur des distances plus ou moins grandes selon leur concentration dans les échantillons. Or, la forme  $C_4$ , peu mobile du fait de sa taille, traverse les gels d'affinité sur des distances  $d_i < d_0$  [ $d_0$  ( $T = 6\%$ ,  $L = 0$ ) = 8–10 mm]; durant son parcours, elle est donc en compétition avec ces protéines et sa mobilité relative ne reflète plus son affinité spécifique pour le ligand.

#### *Étude des formes moléculaires isolées par électrophorèse*

En travaillant avec les formes moléculaires isolées par pré-électrophorèse à  $T = 6\%$ , nous avons pu estimer les constantes de dissociation apparentes des formes  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$  inaccessibles dans les conditions précédentes, et confirmer les valeurs obtenues pour les formes  $C_1$  des trois phénotypes (Fig. 3).

Pour le phénotype U, nos résultats (Tableau I) sont comparables en ce qui concerne  $C_1$ ,  $C_3$  et  $C_4$  à ceux auxquels nous avons eu accès avec l'enzyme purifiée. L'affinité relativement élevée de la forme  $C_2$  est, à première vue, paradoxale. En effet, cette enzyme est constituée d'un monomère  $C_1$  lié par un pont disulfure [23] à une sous-unité plus petite, dépourvue d'activité. Cependant,  $C_2$  possède des propriétés électriques particulières [24] apparaissant essentiellement liées à la nature de cette seconde sous-unité dont la surface pourrait comporter un nombre relativement élevé de résidus aspartates et/ou glutamates. La présence de ces groupements pourrait donc expliquer la haute affinité de  $C_2$  vis-à-vis du présent ligand cationique.

Le rapport des constantes de dissociation pour les quatre formes moléculaires des phénotypes U et A est voisin de 2 (Tableau I). L'affinité réduite de l'enzyme "atypique" par rapport à l'enzyme "usuelle" traduit l'altération du sous-site anionique du centre actif et apporte un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de Kalow et Davies [4]. Cependant, la différence d'affinité apparente entre les formes moléculaires des deux allozymes apparaît moins

importante que ne le laissait prévoir les écarts entre les volumes d'éluion des formes  $C_4$  des homozygotes ( $A_4$  et  $U_4$ ) et de l'hétérozygote UA ( $A_4, A_3U, A_2U_2, AU_3$  et  $U_4$ ) lors de leur séparation par chromatographie d'affinité sur diaminocaproyl-phényltriméthylammonium-Sépharose 4B [9]. Un calcul approché, tenant compte des observations d'O'Carra et al. [25], effectué à partir des données chromatographiques de La Du et Choi [9], permet d'attribuer au rapport de  $K_{D\text{ app}}$  ( $C_4$ ) des phénotypes A et U une valeur minimale de 4.5.

Ce meilleur pouvoir séparateur de la chromatographie d'affinité tient à plusieurs facteurs. La présence du bras espaceur  $\epsilon$ -aminocaproyle éloignant le ligand du support diminue les effets de matrice non spécifiques et les contraintes stériques, et favorise l'accessibilité de l'enzyme à l'affinant. En électro-

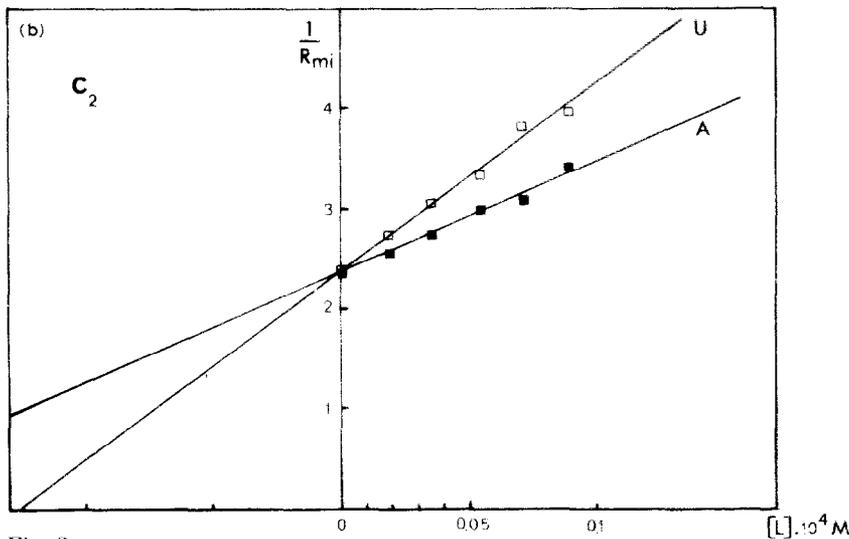
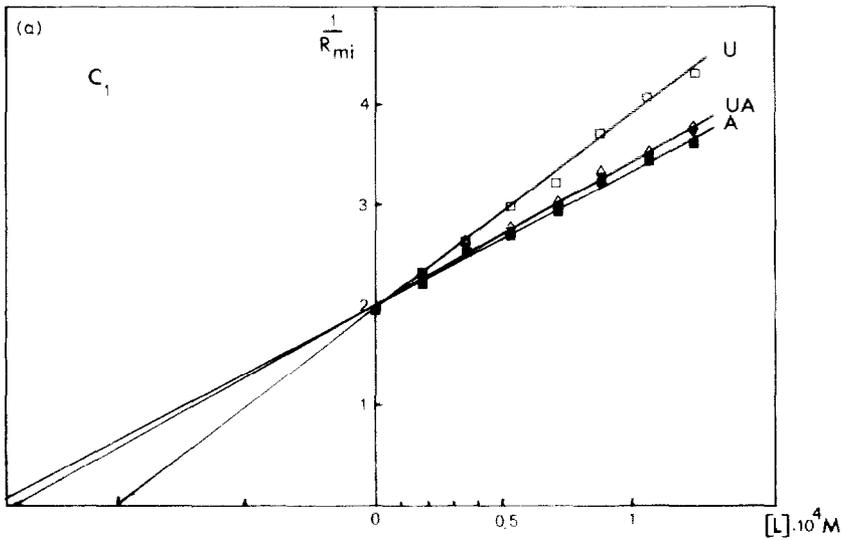


Fig. 3.

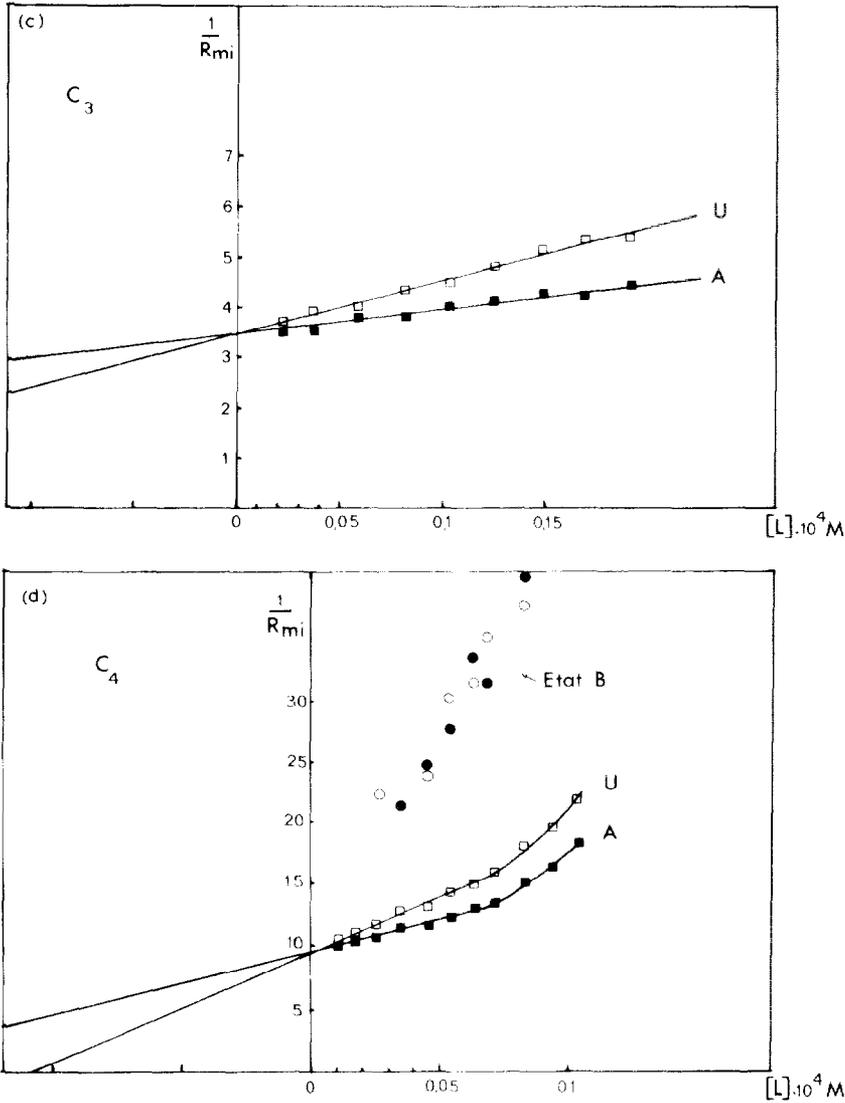


Fig. 3. Courbes représentatives de la variation de  $R_{mi}^{-1}$  en fonction de  $L$  pour les quatre formes moléculaires des phénotypes U, A et UA isolées après pré-électrophorèse des plasmas ( $T = 6\%$ ,  $L = 0$ ). (a) Forme  $C_1$ , (b) forme  $C_2$ , (c) forme  $C_3$ , (d) forme  $C_4$ .

phorèse d'affinité, la situation est plus complexe [26]. Dans notre cas, le ligand est directement couplé à une chaîne de polyacrylamide emprisonnée dans les mailles d'un gel de faible porosité. Une microdistribution en îlots du ligand peut provoquer au sein de ce gel des perturbations locales de la force ionique et du champ électrique. Par ailleurs, sous la pression du champ électrique, des transitions de phase du gel, induites par le ligand chargé, ne sont pas à exclure [27]. Ainsi, la conjonction d'effets stériques et électriques doit favoriser des interactions coulombiennes non spécifiques, entre la surface de l'enzyme et le ligand, et entraîner une diminution du pouvoir discriminant de ce dernier vis-à-vis des allozymes.

Concernant le phénotype UA, la chromatographie d'affinité ne peut séparer nettement les cinq tétramères de ce phénotype. Dans nos conditions expérimentales, leur séparation a été totalement impossible et les valeurs des  $K_{D \text{ app}}$  pour les formes  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$ , fluctuant entre celles des formes correspondantes U et A, n'ont pu être déterminées. Pour la forme  $C_1$ , nos résultats sont comparables à ceux obtenus directement sur le plasma (Tableau I, Fig. 1 et 3a): l'affinité de  $C_1$  (UA) apparaît intermédiaire entre celle de  $C_1$  (U) et celle de  $C_1$  (A). Toutefois, à partir de  $L = 0.2 \cdot 10^{-4} M$ , sur le côté anodique de la zone  $C_1$ , un épaulement apparaît de façon inconstante. Pour des concentrations plus fortes en ligand, une seconde zone, peu intense mais plus mobile, correspondant vraisemblablement à  $C_1$  de type A, émerge peu à peu du pic principal ( $C_1$  de type U).

La synthèse de ligands au pouvoir discriminant élevé permettant de séparer par électrophorèse d'affinité les différents hybrides de chaque forme moléculaire du phénotype UA constitue l'un de nos objectifs. Sa réalisation est la condition nécessaire au développement de cette technique pour le phénotypage des variantes de la cholinestérase du plasma humain.

## CONCLUSION

La technique d'électrophorèse d'affinité que nous développons, bien que permettant de mettre en évidence des différences fonctionnelles minimales entre des allozymes, ne peut, dans son état actuel, être appliquée au phénotypage des variantes de la cholinestérase du plasma humain. Cet aspect pratique ne pourra être abordé qu'après levée de l'obstacle que constitue la présence, dans le plasma, d'autres protéines compétitives de la cholinestérase. La résolution de ce problème passe par la recherche de nouveaux ligands de spécificité plus étroite et plus discriminants et/ou par la mise en oeuvre de techniques d'électrophorèse d'affinité bidimensionnelle.

Au plan général, une telle démarche devrait permettre d'appliquer l'électrophorèse d'affinité, d'utilisation encore peu répandue en biochimie génétique [28, 29], à l'étude des iso- et allozymes dans des milieux biologiques complexes et entraîner un élargissement du champ du polymorphisme biochimique au-delà de la variabilité électrophorétique mise en évidence par les techniques habituelles d'électrophorèse et d'isofocalisation sur gel.

## RÉSUMÉ

L'électrophorèse d'affinité a été appliquée à l'étude des formes moléculaires de trois phénotypes de la cholinestérase du plasma humain, l'enzyme usuelle U, l'enzyme atypique A et l'intermédiaire UA. Les électrophorèses ont été effectuées dans des gels de polyacrylamide contenant un dérivé macromoléculaire hydrosoluble du *m*-amino(substitué)phényltriméthylammonium immobilisé dans la matrice.

Les constantes de dissociation apparentes ( $K_{D \text{ app}}$ ) ont été estimées à partir de la mesure des mobilités en fonction de la concentration en ligand.

Le rapport des  $K_{D \text{ app}}$  des formes moléculaires des phénotypes A et U, approximativement égal à 2, est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le site anionique de l'enzyme atypique est modifié.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions particulièrement le Professeur H.K. Hanel (Hôpital Bispebjerg, Copenhague), le Docteur H. Vergnes (Centre d'Hématologie du C.N.R.S., Hôpital Purpan, Toulouse) et Mr. P. Burnat (Hôpital Fernand-Widal, Paris) qui nous ont fourni les plasmas renfermant l'enzyme "atypique" ( $E_1^a E_1^a$ ).

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 S.S. Brown, W. Kalow, W. Pilz, M. Whittaker et C.L. Woronick, *Advan. Clin. Chem.*, 22 (1981) 1.
- 2 H. Harris, D.A. Hopkinson, E.B. Robson et M. Whittaker, *Ann. Hum. Genet.*, 26 (1963) 359.
- 3 M. Whittaker, *Anaesthesia*, 35 (1980) 174.
- 4 W. Kalow et R.O. Davies, *Biochem. Pharmacol.*, 1 (1958) 183.
- 5 S.W. Clark, G.A. Glaubiger et B.N. La Du, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151 (1968) 710.
- 6 H.W. Goedde, K.R. Held et K. Altland, *Mol. Pharmacol.*, 4 (1968) 274.
- 7 O. Lockridge et B.N. La Du, *J. Biol. Chem.*, 253 (1978) 361.
- 8 R.J. Valentino, O. Lockridge, H.W. Eckerson et B.N. La Du, *Biochem. Pharmacol.*, 30 (1981) 1643.
- 9 B.N. La Du et Y.S. Choi, dans C. Markert (Editeur), 3rd Int. Conf. Isozymes, 1974, Vol. 2, Academic Press, New York, 1975, p. 877.
- 10 H. Muensch, A. Yoshida, K. Altland, W. Jensen et H.-W. Goedde, *Amer. J. Hum. Genet.*, 30 (1978) 302.
- 11 P. Masson, A. Privat de Garilhe et P. Burnat, *Biochim. Biophys. Acta*, 701 (1982) 269.
- 12 P. Masson, F. Germani et M. Plasse, *C.R. Acad. Sci. Ser. D*, 289 (1979) 537.
- 13 P. Masson, A. Sussmilch et J.P. Charlet, *C.R. Acad. Sci. Ser. D*, 290 (1980) 857.
- 14 W. Kalow et K. Genest, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35 (1957) 339.
- 15 H. Harris et M. Whittaker, *Nature (London)*, 191 (1961) 496.
- 16 P. Juul, *Clin. Chim. Acta*, 19 (1968) 205.
- 17 K. Takeo et S. Nakamura, *Arch. Biochem. Biophys.*, 153 (1972) 1.
- 18 C.L. Markert et R.L. Hunter, *J. Histochem. Cytochem.*, 7 (1959) 42.
- 19 J. Picard, *C.R. Acad. Sci. Ser. D*, 282 (1976) 235.
- 20 J.D. Berman et M. Young, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68 (1971) 395.
- 21 S.L. Chan, D.Y. Shirachi, H.N. Bhargava, E. Gardner et A.J. Trevor, *J. Neurochem.*, 19 (1972) 2747.
- 22 E.G. Hollunger et B.H. Niklasson, *Acta Physiol. Scand.*, 111 (1981) 335.
- 23 P. Masson, résultats non publiés.
- 24 P. Masson, *Biochim. Biophys. Acta*, 578 (1979) 493.
- 25 P. O'Carra, S. Barry et T. Griffin, *Biochem. Soc. Trans.*, 1 (1973) 289.
- 26 V. Hořejší, *Anal. Biochem.*, 112 (1981) 1.
- 27 T. Tanaka, D. Fillmore, S.-T. Sun, I. Nishio, G. Swislow et A. Shah, *Phys. Rev. Lett.*, 45 (1980) 1636.
- 28 A.A. Adinolfi et D.A. Hopkinson, *Ann. Hum. Genet.*, 43 (1979) 109.
- 29 A.L. Archibald, *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, 12 (1981) 249.
- 30 S. Hjertén, *Arch. Biochem. Biophys.*, Suppl. 1 (1962) 147.