

Policlinique Universitaire de Médecine de Genève
(Directeur : Prof. E. Martin)
Istituto di Genetica medica e gemellologia « G. Mendel » - Roma
(Direttore: Prof. L. Gedda)

Bruno Antonini

Assistant à l'Institut « G. Mendel » de Rome
et Boursier de l'Université de Genève.

Étude immuno-électrophorétique des protéines sériques des jumeaux nouveaux-nés

La composition protidique qualitative et quantitative du sérum fœtal se distingue de celle de l'adulte par l'absence de certaines fractions qui n'apparaissent que dans les premiers mois de la vie extra-utérine.

Nous nous proposons de préciser la date d'apparition de ces fractions en observant leur comportement chez les jumeaux par la méthode immuno-électrophorétique.

Matériel et méthodes

Notre étude comporte les jumeaux nés à la Maternité de Genève d'avril à août 1958. Le sang était prélevé à la naissance au cordon ombilical, puis obtenu tous les dix jours par ponction du talon. La méthode de Grabar et Williams modifiée en micro-méthode par Scheidegger (1) permet l'analyse de quantités de sang minimales.

Des lames hématologiques sont revêtus d'une couche de gélose à 2% en solution tampon (pH 8,2) à raison de 2 cc par lame. Une fente longitudinale flanquée latéralement de 2 trous pouvant contenir 1 mm³ de sérum est pratiquée dans la couche de gélose. La lame contenant le sérum dans les trous *ad hoc* est d'abord soumise à l'électrophorèse pendant 35 minutes. Puis un immunsérum approprié est coulé dans la fente (parallèle à l'axe de migration des protéines) et on laisse diffuser pendant 24 heures. Le contact des anticorps de l'immunsérum, qui diffusent latéralement, avec les antigènes précédemment séparés, détermine dans la gélose des lignes de précipitation arquées et paraboliques qui s'entrecroisent. Une fois la gélose desséchée et réduite à une mince pellicule transparente, ces lignes sont mises nettement en évidence par coloration.

Nous avons employé l'immunsérum spécifique précipitant, antisérum humain du cheval no. 491 de l'institut Pasteur de Paris. Le colorant utilisé est l'amidoschwarz en solution alcool méthylique acide acétique en proportion de 9/1.

Cette méthode nous permet une triple analyse du sérum:

A) Séparation en milieu stable et transparent des divers constituants d'après leur vitesse de migration électrophorétique.

B) Identification immunochimique des diverses fractions au moyen d'un immunsérum adéquat qui permet d'obtenir des lignes de précipitation très nettes.

C) Mise en évidence des précipités par coloration élective.

Vu le grand nombre de lignes de précipitation obtenu avec un immunsérum complet les résultats sont d'une lecture difficile (fig. 1). On peut pallier à cet inconvénient par l'absorption préalable des anticorps de l'immunsérum au moyen des antigènes correspondants du sérum en étude, en l'occurrence, celui des jumeaux. L'immunsérum ainsi épuisé ne comporte plus que les anticorps dont les antigènes correspondants ne se trouvent pas dans le sérum en étude; il suffit alors de mettre cet immunsérum en contact avec un pool de sérum humain d'adulte normal pour obtenir quelques lignes de précipitation bien nettes qui mettent en évidence les anticorps absents.

Pratiquement on procède de la façon suivante (fig. 3). L'immunsérum épuisé par le sérum des jumeaux respectifs est coulé dans une fente longitudinale pratiquée de part et d'autre d'une perforation contenant le sérum du pool, qui a été soumis à une électrophorèse préalable. On obtient ainsi, entre les deux fentes, une image en miroir des lignes de précipitation, expression directe des réactions entre le sérum du pool et les immunsérums épuisés, autrement dit entre les antigènes *absents* chez les jumeaux et les anticorps correspondants d'un sérum d'adulte normal. Ainsi la confrontation de la composition sérique entre les deux jumeaux est simple et immédiate. Les deux trous latéraux sont destinés à recevoir les sérums des jumeaux en vue d'une épreuve témoin. Précisons que ces électrophorèses sont pratiquées sur des sérums en dilution croissante pour éviter de passer à côté d'une dilution optimale indispensable à la réaction antigène-anticorps, car il est bien connu qu'un excès d'antigènes peut provoquer une redissolution du précipité.

Certains examens complémentaires notamment le dosage des protéines totales par la micro-méthode à la thyrosine et l'électrophorèse sur gélose d'après la micro-méthode de Monnier (5) ont été pratiqués (Nous remercions vivement Mr. le doct. J. Monnier qui a aimablement accepté d'effectuer ces dosages).

Résultats

Tous les examens pratiqués à la naissance ont mis en évidence l'absence de trois fractions: l'une en position α_2 et deux en position β_2 (β_2A et β_2M). Cette composition sérique correspond à celle de la fin de la période fœtale (2). Les examens périodiques subséquents ont mis en évidence l'apparition des fractions protidiques manquantes à des périodes successives allant de 4 semaines à 5 mois.

Fig. 1. Image immuno-électrophorétique de sérum humain total. De gauche à droite: albumine, groupes des α et β globulines, gamma globuline

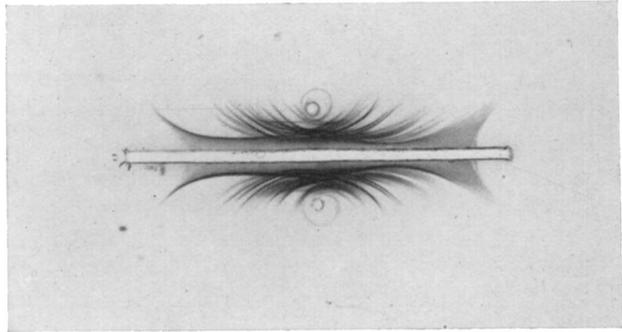


Fig. 2. (D'après Grabar). En haut: analyse immuno-électrophorétique d'un sérum humain normal; au milieu: lignes de précipitation spécifiques typiques (a), en bas: électrophorèse classique (b, c)

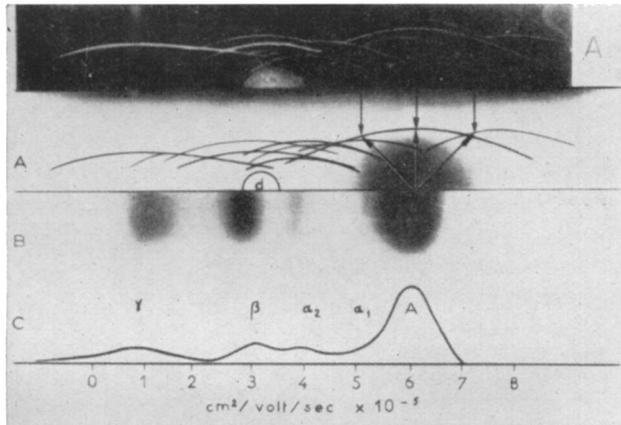
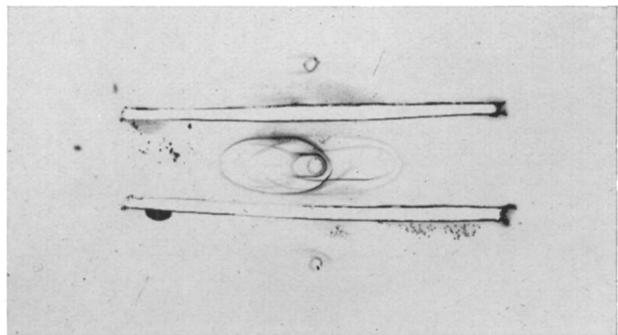


Fig. 3. Immuno-électrophorèse des sérums d'une paire de jumeaux à la naissance après épuisement préalable par l'immunsérum de cheval antisérum humain. Absence des antigènes: α_2 β_2 A β_2 M



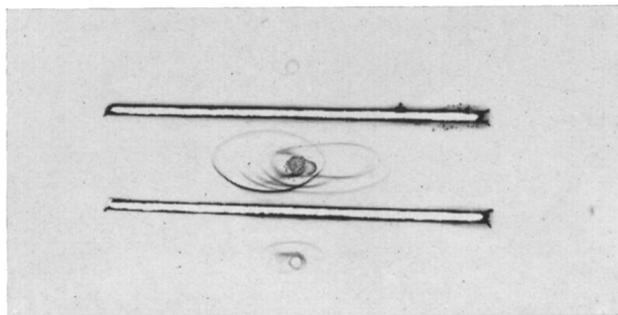


Fig. 4. Jumeaux dizygotes. Apparition unilatérale de la fraction $\beta_2 M$ chez l'un des jumeaux au cours de la croissance

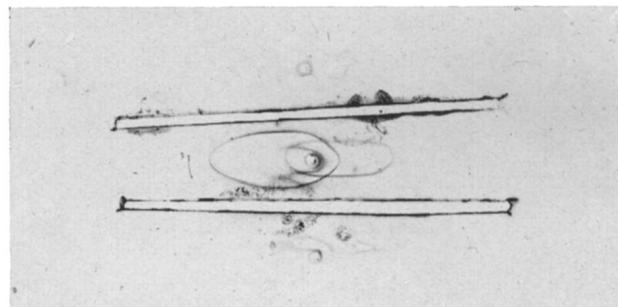


Fig. 5. Apparition contemporaine de la fraction $\beta_2 M$ chez les 2 jumeaux monozygotes

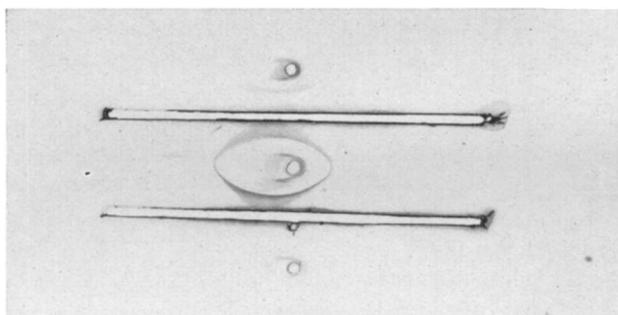


Fig. 6. Apparition des 2 fractions β_2 . Les lignes de précipitation observées sur cette immuno-électrophorèse indiquent l'absence simultanée des fractions α_2 .

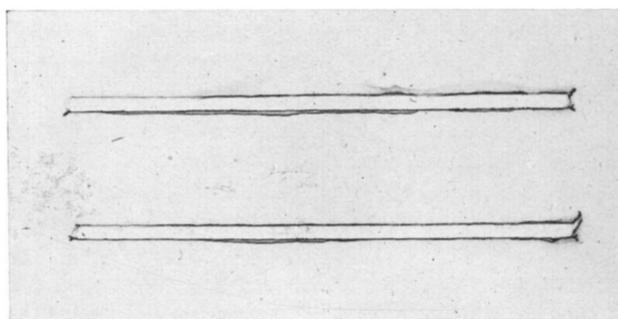


Fig. 7. Immuno-électrophorèse des sérums des jumeaux. Aucune ligne de précipitation n'est apparue étant donné que la composition de ces sérums est la même que celle de l'adulte

Les jumeaux furent répartis en groupes monozygote et dizygote par les méthodes d'analyse génétique habituelles. Les enfants furent maintenus dans les mêmes conditions de vie, notamment en ce qui concerne l'alimentation. Nous avons observé dans presque tous les cas monozygotes, l'apparition successive, simultanée pour chaque paire de jumeaux, des différentes fractions. Chez les dizygotes par contre l'apparition d'une même fraction n'était pas simultanée chez les 2 jumeaux bien que la discordance dans le temps ne fût pas très large (figg. 4, 5, 6).

Les examens complémentaires nous ont été d'une utilité indirecte dans ce sens que le dosage des protéines totales par exemple, a présenté des valeurs normales pour l'âge des sujets. Les modifications de la composition protidique quantitative des sérums aux différentes périodes auxologiques n'a présenté de particularités ni dans un groupe ni dans l'autre. En outre, le fractionnement électrophorétique a donné des courbes exprimant des pourcentages de protéines tout à fait normaux pour l'âge envisagé. Ces données ainsi que le développement ultérieur des jumeaux nous permettent de conclure que nous avons travaillé sur des sujets normaux.

Discussion

Nous ne doutons pas que la méthode que nous avons appliquée soit valable. Des analyses pratiquées on peut déduire 2 éléments:

A) La concordance chez les jumeaux monozygotes des synthèses protidiques considérées.

B) La discordance significative de ces synthèses chez les jumeaux dizygotes. Il n'est évidemment pas possible d'exprimer les résultats obtenus en pourcentages. Toutefois, il est incontestable que la confrontation directe des jumeaux nous autorise à des conclusions d'autant plus valables que la concordance chez les jumeaux monozygotes est confirmée par une discordance correspondante chez les dizygotes. Si un élément déterminé n'était pas en cause, les constatations faites ne devraient pas varier avec le zygotisme des jumeaux.

Etablir le déterminisme génétique de ces synthèses protidiques et le mécanisme qui préside à ces synthèses n'est pas chose facile. D'après le principe de la génétique classique on peut admettre qu'un caractère donné est sous contrôle d'un facteur monomère, à condition qu'il s'agisse d'un caractère simple qui n'est pas fractionné au cours des générations successives. Parmi les nombreux caractères qui remplissent ces conditions, les antigènes groupaux forment un exemple typique.

Les fractions protidiques que nous avons étudiées ne sont rien d'autre que des antigènes. Leur synthèse est assurée par l'action de système d'enzymes sur des substrats appropriés et les enzymes synthétisants sont sous contrôle d'unités géniques. Il existe un rapport direct entre les gènes et les enzymes en question, et il est très probable que ce rapport est extrêmement simple à savoir que chaque facteur est lui-même un enzyme ou un proenzyme dont la structure chimique est basée directement sur le modèle génique. On pourrait se demander si le facteur génique qui régit la synthèse des protéines est unique ou multiple, c'est à dire si c'est le même gène qui

contrôle toute la chaîne métabolique intermédiaire ou si chaque élément de cette chaîne est sous la dépendance d'un gène spécifique. La complexité et la variabilité de la structure de la molécule protidique reflète peut être l'image de ce qui se passe au niveau de la substance génique.

L'étude du métabolisme intermédiaire et des maladies métaboliques, par l'application des méthodes génétiques nous permettent de constater combien souvent l'absence anormale de certaines synthèses protidiques est congénitale et présente une répartition familiale bien définie. On peut admettre dans ces cas, qu'une lésion du gène ait provoqué une mutation qui se traduit par l'absence de la synthèse d'un enzyme ou par une modification de sa structure. A cet égard on peut citer l'afibrinogénémie, l'agammaglobulinémie, certains troubles de la coagulation dus à l'absence d'un ou plusieurs facteurs de la coagulation, les hémoglobinopathies génotypiques et l'alcaptonurie.

La pathologie a démontré que certaines fractions protidiques sont sous le contrôle héréditaire des gènes. De plus le taux des protides présente des variations significatives entre les deux grandes races nègroïde et euroïde (14, 15) et certaines différences individuelles et analogies familiales sur le plan immunochimique ont été constatées chez les animaux (16).

Bien que l'on ait admis que les protéines sériques, produits de synthèse des cellules, possédaient une structure constante propre à l'espèce, les méthodes de précipitation et d'épuisement croisés ont mis en évidence une certaine variété antigénique qui tend à prouver l'existence d'une individualité intraspécifique des protéines sériques.

L'extension de nos connaissances dans le domaine des groupes sanguins et plus récemment des groupes hémoglobiniques appuyerait la notion d'une spécificité groupale des protéines sériques: l'électrophorèse des protéines sériques sur gel d'amidon a mis en évidence la diversité du comportement des fractions situées entre α_2 et les β globulines où trois petites fractions ont pu être identifiées à l'haptoglobine (21). Ces fractions ont permis de distinguer 3 groupes sériques qui constituent le système de l'haptoglobine. Il s'agit d'un système héréditaire qui serait sous contrôle de deux allèles autosomes Hp^1 et Hp^2 (11) déterminant deux groupes homozygotes $Hp^1 Hp^1$, $Hp^2 Hp^2$, et un groupe hétérozygote $Hp^1 Hp^2$.

Citons encore un autre facteur sérique, le facteur Gm qui inhibe l'agglutination des globules rouges Rh +, sensibilisés au préalable au moyen d'un sérum anti-Rh, par le sérum des malades atteints de polyarthrite chronique évolutive (22). Il s'agit d'un caractère héréditaire sous la dépendance de deux allèles Gm a et Gm (23). Le facteur Gm est localisé au niveau des gammaglobulines où il constitue un nouveau système antigénique.

Certains travaux tendent à établir des corrélations entre les divers systèmes précités et les groupes sanguins (24).

Cependant les acquisitions de la génétique biochimique sont encore trop rares pour déterminer avec certitude le fonction des gènes et surtout leur mécanisme d'action.

Je tiens à remercier M. le Dr Jean-Jacques Scheidegger des conseils qu'il a bien voulu me prodiguer.

Bibliographie

1. SCHEIDEGGER, J. J.: Une Microméthode de l'immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy*, 7, 103, 1955.
2. SCHEIDEGGER, J. J., MARTIN E., RIOTTON, G.: L'apparition des diverses composantes antigéniques du sérum au cours du développement fœtal. *Journal Suisse de Médecine*, 86, 9, 1956.
3. SCHEIDEGGER, J. J., MARTIN DU PAN, R.: Etude Immuno-électrophorétique des protéines sériques du nouveau-né et du nourrisson. *Etudes Néo-natales*, 6, 3, 1957.
4. MARTIN, E., SCHEIDEGGER, J. J.: Aperçu des renseignements fournis par l'Immuno-électrophorèse. *Bulletin de l'Accadémie Suisse des Sciences Médicales*, 13, 5-6, 1957.
5. MONNIER, J., FISCHER, R., Analyses hémoglobiniques et sériques par micro-électrophorèse sur gélose, à paraître.
6. GALDO, A., CRUZ, M., ESTEBAU, B.: Estudio electroforético de las proteínas plasmáticas en el recién nacido normal. *Acta Pediatrica Española*, 16, 181, 1958.
7. BUSTAMANTE, W.: Estudio electroforético de las proteínas del lactante. *Rev. Chil. Pediat.*, 23, 27, 1952.
8. MARTIN DU PAN, R., MOORE, D.: Les protéines du sérum sanguin chez le fœtus et le nourrisson de moins d'un an. *Ann. Paediat.*, 171, 290, 1948.
9. VELASCO, C.: Microelectroforesis en papel de las proteínas del suero de recién nacidos y lactantes normales. *Rev. Chil. Pediat.*, 63, 2, 1956.
10. HALDANE, J. B. S.: *The Biochemistry of Genetics*, 1954.
11. SMITHIES, O., WALKER, N. F.: Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature*, 176, 4496, 1955.
12. BOOK, J. A.: Medicinsk genetik och biochemi. *Svenska Läkartidningar*, 51, 45, 1954.
13. NEUBERGER, A.: Biochemical genetics. *Lectures on the scientific basis of medicine*, 2, 1952-1953.
14. RAWNSLEY, H. M., YONAN, V. L., REINHOLD, J. C.: Serum protein concentrations in the North American Negroid. *Science*, 123, 3205, 1956.
15. LONG, W. H., NASSIF, R., YONAN, V., REINHOLD, J. C.: Further Studies on racial differences in serum gamma globulin concentrations. *Clin. Chem.*, 2, 4, 1956.
16. THOMPSON, S., FOSTER, J. F., GOWEN, J. W., TAUBER, D. E.: Hereditary differences in serum proteins of normal mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87, 1954.
17. RUFFIÉ, J.: Les groupes sanguins hémoglobiniques. *Toulouse médical*, 58, 7, 1957.
18. SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, 4, 1955.
19. OUDIN, J.: L'allotypie de certains antigènes protidiques du sérum. *C. R. Acad. Sci.*, 242, 1956.
20. CUMLEY, R. W., IRWIN, M. R.: Individual specificity of human serum. *J. Immunology*, 46, 63, 1943.
21. SMITHIES, O., FORD WALKER, N. F.: Notation for serum protein groups and the genes controlling their inheritance. *Nature*, 178, 4535, 1956.
22. GRUBB, R.: Agglutination of erythrocytes coated with «incomplete» anti Rh. by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. The existence of human serum groups. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 39, 3, 1956.
23. GRUBB, R., LAURELL, A. B.: Hereditary serological human serum groups. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 39, 6, 1956.
24. LAURELL, A. B., GRUBB, R.: The Hp and Gm groups and secretor characters of 46 blood donors. *Vox Sanguinis*, 2, 5, 1957.

RIASSUNTO

Le numerose frazioni proteiche del siero umano che la tecnica di analisi immunoelettroforetica ha permesso di conoscere, appaiono in tempi successivi durante lo sviluppo fetale e sono in numero definitivo al quinto mese di vita extrauterina.

L'impiego di gemelli, utilizzando sia i gemelli monozigotici che quelli dizigotici, per lo studio delle frazioni proteiche seriche ha permesso di precisare l'epoca di apparizione delle frazioni assenti alla nascita e cioè una frazione α^2 e due frazioni β^2 .

Si è constatato come la sintesi delle frazioni sia simultanea nei gemelli MZ. e sensibilmente discordante nel tempo nei gemelli DZ., essendo la loro apparizione variabile in un periodo che va da quattro settimane a cinque mesi di vita.

Tale osservazione porta alla ammissione che il sistema proteico possa essere sottoposto ad un molteplice controllo genetico essendovi meccanismi singoli per ogni famiglia di frazioni o per singole frazioni proteiche.

Si termina passando in rassegna le acquisizioni sui gruppi serici.

SUMMARY

The numerous protein fractions of human serum, which can be determined by immunoelectrophoretic analysis, appear one after another in the course of fetal development. By the fifth month after birth they are all present. Examining the protein fractions in monozygotic and dizygotic twins, it is possible to find the exact time of appearance of those fractions which are missing at birth, i.e. a single α^2 -fraction and two β^2 -fractions.

The appearance of these three fractions always varies from four weeks to five months after birth.

We were able to demonstrate that the synthesis of these fractions took place at the same time in monozygotic twins and at different times in dizygotic twins.

These observations confirm the hypothesis that the synthesis of proteins—either singly or in groups—may be submitted to multiple genetic influences.

Finally present concepts of the protein « serum-groups » are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Die zahlreichen Proteinfractionen des menschlichen Serums, die die Technik der immunoelektrophoretischen Analyse zu unterscheiden erlaubt, entstehen nacheinander im Verlauf der fetalen Entwicklung und sind bereits im fünften Monat nach der Geburt vollzählig vorhanden.

Die Untersuchungen der Proteinfractionen des Serums von eineiigen und zweieiigen Zwillingen erlaubt die Bestimmung des Zeitpunktes des Auftretens der bei der Geburt noch fehlenden Fraktionen, einer α^2 -Fraktion und zwei β^2 -Fraktionen.

Wir konnten nachweisen, dass der Aufbau der verschiedenen Fraktionen bei monozygoten Zwillingen zur gleichen Zeit, bei dizygoten Zwillingen hingegen zu deutlich unterschiedlichen Zeitpunkten stattfand. In jedem Fall jedoch schwankt der Zeitpunkt des ersten Auftretens zwischen vier Wochen und fünf Monaten post partum.

Diese Beobachtungen bestätigen die Hypothese, dass der Aufbau der Proteine — entweder gruppenweise oder nach Einzelfractionen — multiplen genetischen Einflüssen unterworfen ist.

Abschliessend werden die neueren Erkenntnisse über die « Serumgruppen » der Proteine besprochen.