

Jania 1964

RECHERCHES SUR LA PRECIPITATION DES PROTEINES
PAR L'ACIDE BORIQUE

par R.MASSEYEFF, J.GOMBERT, J.JOSSELIN et I.SECK. (*)

Les sérums de malades atteints de trypanosomiase africaine constituent une source commode de β_2 -macroglobuline, car le taux de cette protéine y est remarquablement élevé (9). Cherchant à améliorer la méthode de fractionnement que nous avons mise au point au cours de recherches sur cette maladie (4,8) nous nous sommes demandé si l'action de l'acide borique décrite par BADIN (1) sur les protéines sériques des sérums de rhumatisants, ne pourrait être utilisée dans ce but. Cet auteur a en effet montré que la dilution d'un volume de sérum de rhumatisant dans vingt volumes d'une solution d'acide borique à 20 g/l entraîne la précipitation rapide d'une fraction représentant environ 12 p. 100 des protéines sériques et contenant pratiquement toujours la totalité de la β_2 -macroglobuline caractéristique du facteur rhumatoïde.

Nous avons repris l'étude de ce phénomène pour préciser l'influence de la concentration en acide borique sur la composition quantitative et qualitative du précipité. Cette analyse a été réalisée par électrophorèse et immuno-électrophorèse. Ses résultats nous ont conduit à une interprétation de l'action de l'acide borique.

METHODES.

Les sérums analysés provenaient :

- pour les sérums témoins: du Centre National de Transfusion Sanguine de la République du Sénégal (**),
- pour les sérums de malades atteints de maladie du sommeil: du Centre de Recherches Muraz, Bobo-Dioulasso (Haute-Volta) (**).

La précipitation est conduite comme suit :

Dans un tube à centrifuger contenant 1 ml de sérum on ajoute 20 ml d'une solution d'acide borique: nous avons ainsi utilisé des solutions renfermant 0,5 - 5 - 10 - 20 - 40 et 60 grammes d'acide borique par litre.

(*) Avec la collaboration technique de M.L. Piermé et A. Koukoui.

(**) Nous remercions vivement Mr le Docteur Kane et Mr le Pharmacien Capitaine Bentz qui nous ont procuré ces sérums.

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 28582

Cote : B



Taux de Protéines	Acide borique				Tampon phosphate de Na
	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l	
- Sérum normal 1 63 mg/ml	5,4	9,5	8,6	8,3	7,3
- Sérum normal 2 73 mg/ml	6,1	8,5	10,3	7,3	5,7
- Sérum de trypanosomé 73 mg/ml	13,3	14,0	16,7	8,1	6,1

Tableau 1

Quantité de protéines redissoutes à partir du précipité obtenu par action de diverses solutions d'acide borique exprimées en pour cent de la quantité de protéines du sérum considéré

Après 20-minutes d'attente, le précipité est centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes. Le surnageant est décanté et éventuellement concentré approximativement à 1 ml par ultrafiltration sous vide selon la technique de SMITH (14). Le précipité est repris dans 0,25 ml d'une solution tampon véronal pour électrophorèse de pH = 8,6 et de force ionique $\mu = 0,033$ ou d'une solution tampon Tris (*) 0,1 M/NaCl M de pH = 8,0. (Les précipités se redissolvent en effet parfois plus facilement dans cette dernière solution fortement saline).

Nous avons dosé dans ces solutions les protéines par la méthode de Folin-Ciocalteu selon la variante de LOWRY et coll.(7) ou par la méthode du biuret selon la technique de WEICHELBAUM (16).

La séparation électrophorétique a été réalisée sur des feuilles d'acétate de cellulose (***) de 5 x 10 cm selon la méthode de KOHN (5). Les bandes ont été colorées au Noir Amide 10B. Après imprégnation des bandes par une huile minérale légère, celles-ci deviennent complètement transparentes et une courbe densitométrique peut être tracée (***) .

Nous avons aussi réalisé des électrophorèses en gel d'amidon selon la technique horizontale de SMITHIES (15) avec le système de tampons discontinus de POULIK (10).

La méthode de SCHEIDEGGER (13) avec des modifications mineures a été adoptée pour l'analyse immuno-électrophorétique; les antisérums utilisés étaient :

- un sérum de cheval anti-protéines sériques humaines provenant de la Croix Rouge Hollandaise, Amsterdam - Lot n° 1621,
- un antisérum de chèvre spécifique envers la β_2 -globuline de la firme Hyland Laboratories, Los Angeles - Lot n° G 206-7ABS-3163,
- un antisérum de chèvre spécifique envers la β_2 -macroglobuline provenant de la même maison. Lot n° G 3798 P₃-3163.

RESULTATS

1°) Influence de la concentration en acide borique sur l'abondance du précipité.

Le tableau I montre que la précipitation maximale s'obtient avec des concentrations variant d'un sujet à l'autre mais se situant entre 10 et 20 g/l d'acide borique.

A forte concentration en acide borique le précipité est encore abondant, mais la dénaturation est importante et une bonne part des protéines ne se redissout plus.

(*) Tri-hydroxyméthyl-amino-méthane,

(**) Oxo Ltd, Londres,

(***) Densitomètre Locarte, Londres.

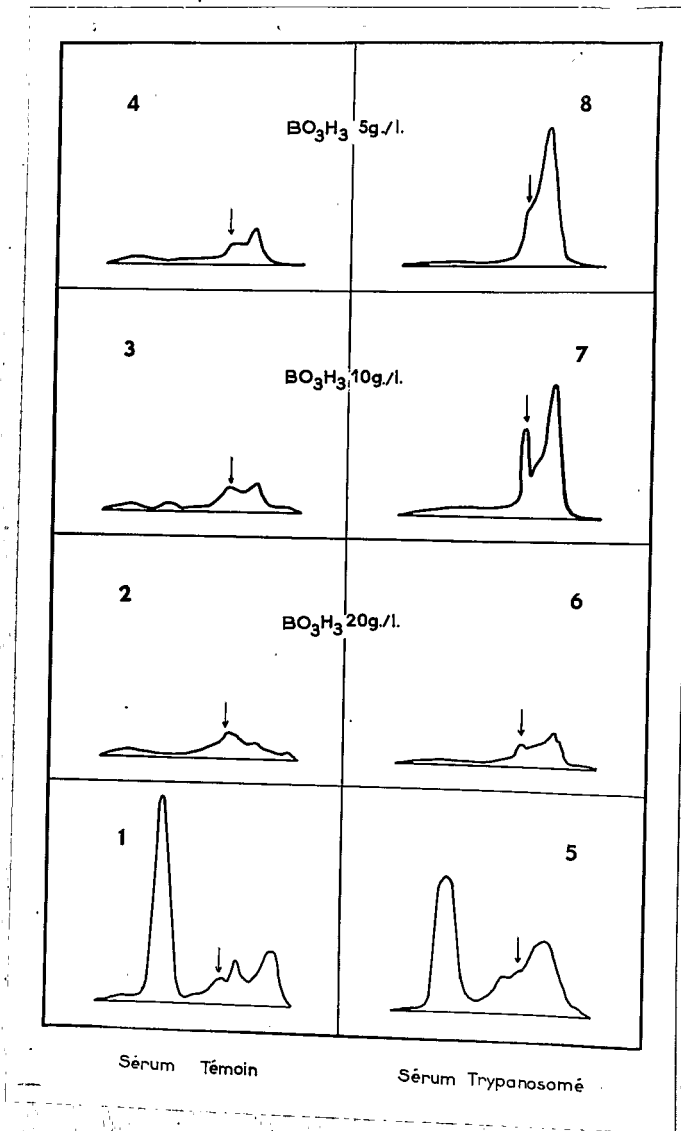
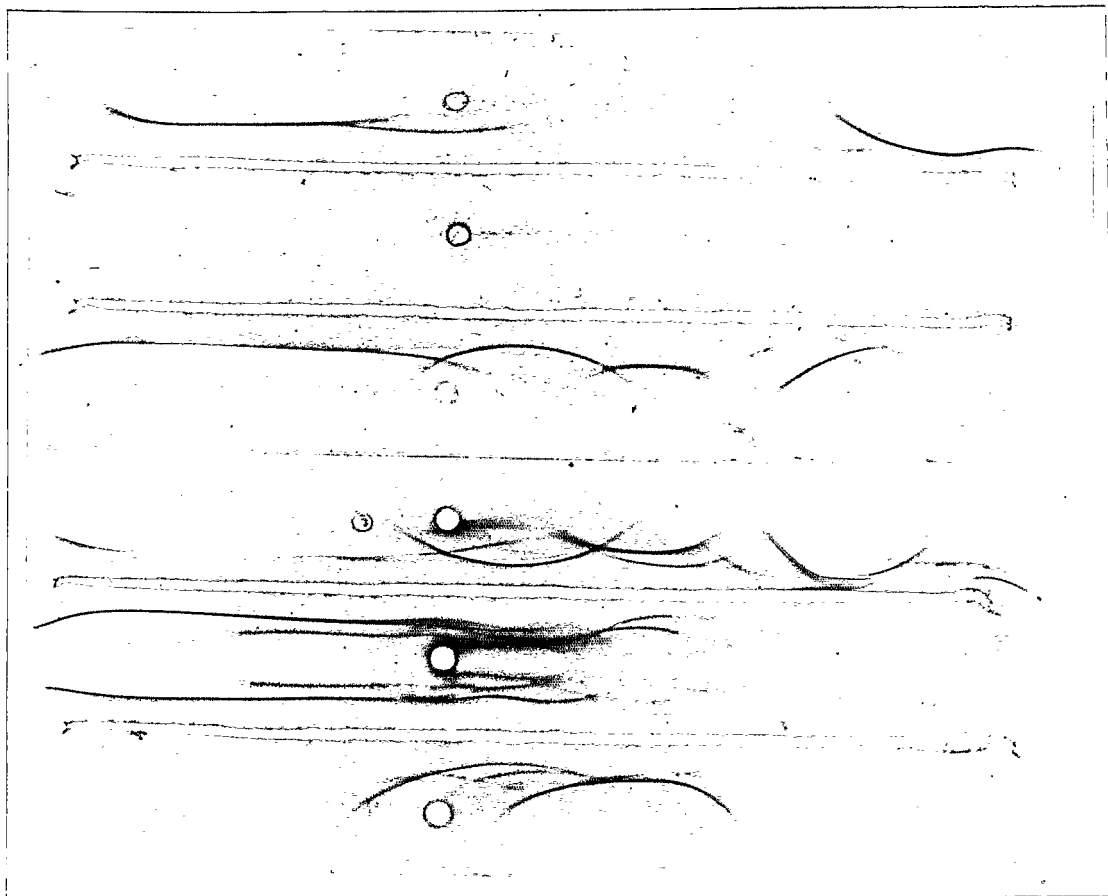


Fig. 1 - Analyse électrophorétique sur acétate de cellulose de sérums non fractionnés et des précipités obtenus par action de diverses solutions d'acide borique.

1.



2.

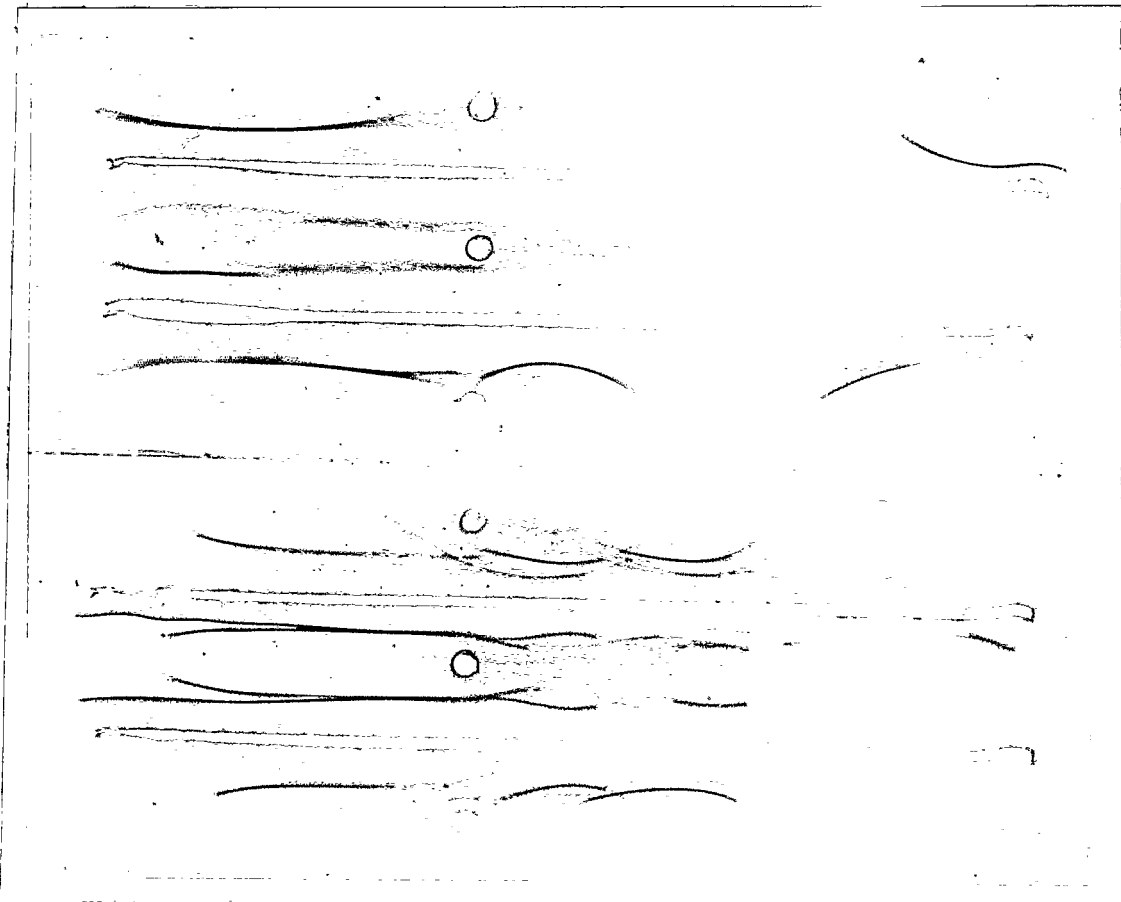


Fig. 2 - Analyse immuno-électrophorétique de sérums avant et après précipitation par l'acide borique à 20 g/l. La révélation immunologique est obtenue à l'aide d'un sérum de cheval anti sérum humain normal.

- A Surnageant concentré 2,2 µl
- B Précipité 0,2 µl
- C Sérum non fractionné 0,2 µl
- D Surnageant concentré 2 µl
- E Précipité 2 µl
- F Sérum non fractionné 2 µl

en 1 Sérum normal

en 2 Sérum de malade atteint de Trypanosomiase africaine à T.gambiense

2°) Influence de la concentration en acide borique sur la composition électrophorétique du précipité.

L'électrophorèse en gel d'amidon ou sur acétate de cellulose, révèle que non seulement la quantité de précipité protéique varie lorsque la concentration de l'acide borique change, mais aussi que sa nature se modifie.

Avec l'acide borique à 60 g/l l'électrophorèse montre essentiellement la présence de protéines dénaturées qui demeurent au point de départ. A la concentration de 40 g/l la dénaturation est moindre et l'on voit de faibles bandes dans la région des α -globulines. A 20 g/l on aperçoit une trace d'albumine puis des bandes d' α_1 - d' α_2 - de β - et enfin de γ -globulines. Leur intensité va régulièrement croissant: très faible au niveau de l'albumine, les taches sont intenses au niveau des γ -globulines (cf. fig.1). La composition du précipité obtenu avec l'acide borique à 10 g/l est similaire, à cela près que les γ -globulines γ sont encore plus abondantes tandis que les fractions antérieures s'estompent. Ceci est encore plus vrai du précipité à l'acide borique à 5 g/l. Enfin, lorsque l'acide borique ne se trouve qu'à la concentration de 0,5 g/l l'aspect qualitatif du précipité demeure le même, mais toutes les bandes sont faibles.

En résumé on constate que si l'on se place à une concentration de 10 g/l d'acide borique, le précipité comporte toutes les fractions sériques, d'autant plus abondantes qu'elles sont plus lentes. Si la concentration en acide borique augmente, le précipité est moins abondant tout en s'enrichissant en α -globulines au détriment des γ et β -globulines. Si elle diminue, le précipité s'amenuise mais ne montre pratiquement que des γ avec un peu de β -globulines.

3°) Analyse immuno-électrophorétique des précipités et des surnageants obtenus avec l'acide borique à 20 et 5 g/l.

Pratiquée sur une dilution au 1/8 de la solution antigénique, l'analyse immuno-électrophorétique renseigne sur les constituants les plus abondants du précipité obtenu avec l'acide borique à 20 g/l (fig. 2). Avec le sérum normal on ne voit guère qu'un peu de γ -globulines.

Le précipité du sérum de trypanosomé est plus riche car on y voit une α_2 -globuline, de la β_2 -macroglobuline et surtout la γ -globuline. Dans les mêmes conditions les surnageants montrent l'abondance de l'albumine. Il existe des arcs correspondant à une α_1 et à une α_2 -globuline. La sidérophiline est abondante. Il reste encore beaucoup de γ -globulines dans le surnageant et on y voit aussi l'arc de la β_2A -globuline.

Lorsqu'on ne dilue pas la solution antigénique, la complexité de l'image est beaucoup plus grande. Dans les précipités on retrouve de l'albumine, un arc α_1 , plusieurs arcs α_2 , plusieurs arcs β_1 , (mais pas celui de la sidérophiline). L'arc de la β_2 -macroglobuline est net et celui des γ -globulines est intense. Avec le sérum de trypanosomé, l'aspect est identique, mais l'arc de la macroglobuline est beaucoup plus fort. Celui des γ -globulines est moins net en raison de l'excès antigénique.

Le précipité obtenu avec l'acide borique à 5 g/l a un aspect général identique. Il y a encore de nombreux arcs dans les régions antérieures, mais

les précipités de la région postérieure du diagramme (β et γ) sont plus intenses.

Les surnageants donnent pratiquement l'image d'un sérum entier normal, ce qui montre qu'une bonne part de la γ -globuline n'est pas précipitée.

La sidérophiline et la β_{2A} -globuline se retrouvent presque intégralement dans le surnageant. En revanche le trait de la β_2 -macroglobuline y est faible, voire même absent.

Le diagramme immuno-électrophorétique du surnageant présente une anomalie par rapport au sérum: une α_1 -globuline voit sa mobilité accélérée: elle devient pré-albuminique et la courbure de son arc diminue beaucoup. La coloration au Noir Soudan montre qu'il s'agit d'une lipoprotéine. La même observation peut être faite si l'on colore ainsi des lames d'électrophorèse en gel de gélose.

DISCUSSION.

Ce travail confirme l'essentiel des conclusions de BADIN (1) c'est-à-dire la possibilité de précipiter rapidement et pratiquement toute la β_2 -macroglobuline par dilution du sérum avec une solution d'acide borique à 20 g/l.

Toutefois nous avons constaté que pour obtenir ce résultat, la concentration d'acide borique à préférer est de l'ordre de 10 g/l, car le précipité est alors plus étroitement localisé à la région β et γ du diagramme électrophorétique.

BADIN émet l'hypothèse que l'insolubilisation du facteur rhumatoïde dans l'acide borique à 20 g/l est lié à l'existence de complexes avec la partie glucidique de cette glyco-protéine (qui représente 12,2 p. 100 du poids de la molécule). Dans cette éventualité, les nombreuses autres glyco-protéines du sérum humain devraient aussi être précipitées. En particulier, la β_{2A} -globuline (dont la teneur en glucides est de 10,7 p. 100 et qui présente de nombreux caractères communs avec la β_2 -macroglobuline) devrait s'insolubiliser, ce qui n'est nullement le cas.

BADIN (1) signale que le précipité borique est comparable au précipité d'eu-globulines obtenu selon la technique de SANDOR (11) mais qu'il est beaucoup plus abondant. Nous avons pu confirmer cette constatation. Ainsi la dilution d'un ml de sérum donne: avec de l'eau un précipité pesant 0,15 mg: avec un tampon phosphate 0,005 M (*) 4,99 mg, tandis qu'avec l'acide borique à 10 et 20 g/l ils pèsent respectivement 6,99 mg et 9,37 mg. Nous avons comparé l'aspect qualitatif de ces deux types de précipité par l'analyse immuno-électrophorétique. Deux échantillons du même sérum ont été dilués avec vingt volumes d'acide borique à 5 g/l (dont la molarité est de 0,081 M) ou de tampon phosphate de sodium 0,005M, pH = 6 (*). Les précipités ont été repris et analysés dans les conditions décrites plus haut, par électrophorèse et immuno-électrophorèse: ils sont parfaitement identiques.

(*) $\text{PO}_4\text{H Na}_2, 2\text{H}_2\text{O} = 0,067 \text{ g/l}$

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}, \text{H}_2\text{O} = 0,638 \text{ g/l}$

dont le pH est de 5,95

.../...

	Conductivité spécifique de la solution	Conductivité spécifique après adjonction de sérum
- Acide borique à 40 g/l	$4,57. 10^{-5}$	$5,71. 10^{-4}$
- Acide borique à 20 g/l	$1,74. 10^{-5}$	$6,25. 10^{-4}$
- Acide borique à 10 g/l	$5,71. 10^{-6}$	$6,25. 10^{-4}$
- Tampon phosphate de sodium 0,005 M	$3,42. 10^{-4}$	$9,81. 10^{-4}$
- Eau	$1,80. 10^{-6}$	$6,25. 10^{-4}$

Tableau 2

Valeur de la conductivité spécifique de diverses solutions avant et après adjonction de sérum normal à raison d'une partie de sérum pour 20 parties de solution. Les mesures ont été faites à 18 °C et sont exprimées en $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

pH de la solution
 après adjonction
 de sérum

Acide borique à 40 g/l	4,08	5,30
Acide borique à 20 g/l	4,46	5,94
Acide borique à 10 g/l	5,14	6,65
Tampon phosphate de sodium 0,005 M	5,95	6,66
Eau	5,50	8,38

Tableau 3

Valeur du pH de diverses solutions
 avant et après adjonction de sérum normal
 à raison d'une partie de sérum pour 20
 parties de solution

Cette similitude ne doit pas étonner si l'on admet, comme nous le proposons que les mécanismes d'action de deux types de solution sont analogues et qu'en conséquence le précipité obtenu par action de l'acide borique, n'est rien d'autre qu'un précipité d'eu-globulines.

L'acide borique étant un acide faible, la force ionique d'une solution assez concentrée comme la solution à 20 g/l est cependant très basse. En tenant compte de la constante de dissociation de la première acidité ($K = 6,4 \cdot 10^{-10}$) et en négligeant les deux autres dont la valeur est infime, il est aisé de calculer la force ionique d'une solution d'acide borique. Elle est de $7,1 \cdot 10^{-6}$ pour l'acide à 5 g/l et de $1,4 \cdot 10^{-5}$ pour l'acide à 20 g/l. Le même calcul pour la solution tampon phosphate (en négligeant la 3ème acidité de l'acide phosphorique) donne une valeur beaucoup plus élevée: $5,75 \cdot 10^{-3}$. En d'autres termes, l'addition d'acide borique même concentré aux protéines sériques, leur procure un environnement ionique plus dilué que la solution tampon phosphate, pourtant peu concentrée. La raison en est que la dissociation des ions sodium est dans ce dernier cas totale. Etant donné que la valeur de la force ionique est le facteur majeur de l'effet de "salting-in" comme pour celui de "salting-out" (3) ceci explique fort bien l'action de l'acide borique. En effet, si l'on prépare une solution à 20 g/l d'acide borique en dissolvant la substance dans une solution de ClNa à 8,5 g p.1000 à la place d'eau et qu'on fasse agir cette solution sur du sérum, on n'observe nulle précipitation.

Une autre confirmation expérimentale de cette hypothèse est donnée par l'étude des valeurs de conductivités (tableau 2) des diverses solutions avant et après le mélange avec du sérum (*). La conductivité dépend en effet, en première approximation de l'état de dissociation ionique du milieu. On remarque la très faible conductivité des solutions d'acide borique. Une solution contenant moins d'un gramme de phosphates de sodium par litre est environ 60 fois plus conductrice qu'une solution à dix grammes d'acide borique par litre. Le mélange de ces solutions boriques à du sérum, conduit à des conductivités aussi faibles que si le mélange avait été fait avec de l'eau. Avec le tampon phosphate la valeur de la conductivité est un peu plus forte.

C'est, à notre sens, en raison du niveau particulièrement bas de la force ionique que l'on obtient un précipité plus abondant avec l'acide borique qu'avec la solution de phosphate de sodium.

Les études de SANDOR (12) sur la précipitation fractionnée des eu-globulines ont nettement montré l'influence du pH sur la quantité et la qualité des protéines précipitées (en raison des points iso-électriques variables des diverses globulines). C'est un effet du même ordre qui explique le glissement du diagramme électrophorétique représentatif du précipité vers les régions rapides lorsque la concentration en acide borique augmente, puisque le pH de la solution diminue comme le montre le tableau 3. On voit que la solution d'acide borique à 10 g/l a un plus faible pouvoir tampon que la solution phosphate, puisque partant de pH différents, elle se retrouve après adjonction de sérum à la même valeur : 6,65. Ceci explique la similitude qualitative des précipités et des surnageants.

Les valeurs de la force ionique et du pH suffisent à expliquer l'essentiel des phénomènes. Cette méthode nous place dans des conditions assez comparables à celle de BIERRY (2) qui a préparé les eu-globulines en faisant barboter, à froid, un courant de CO_2 dans du sérum étendu de 9 fois son volume

(*) Mesures faites à 18°C à l'aide du Resistivimètre Philips modèle GM 4249/01

d'eau. Le pH s'abaisse dans ce cas à 5,6.

Ceci ne nie pas l'existence possible de complexes boriques avec les glycoprotéines. On pourrait les invoquer pour expliquer la dénaturation des protéines à fortes concentrations d'acide borique. En outre, à plus faible concentration une interaction protéine/acide borique est peut-être responsable de l'accélération de l' α_1 lipoprotéine que nous avons signalés plus haut qui devient pré-albuminique. Ce phénomène n'est nullement exceptionnel car il peut être provoqué par addition d'acide gras au sérum ou comme l'a montré récemment LOSTICKY (6) de colorants acides tel que le bleu de bromophénol. Nous avons remarqué que lorsque la précipitation est obtenue par l'action du tampon phosphate de sodium 0,005 M, la même accélération peut être enregistrée. Il est possible que l'acide borique donne lieu à d'autres interactions mais elles nous semblent d'importance secondaire dans le phénomène de précipitation des protéines proprement dit.

Notons, pour terminer, les principaux avantages pratiques de la précipitation des eu-globulines par l'acide borique, que l'on peut utiliser comme première étape d'un fractionnement. Cette méthode est simple, rapide, peu onéreuse, reproductible. Le pouvoir antiseptique de l'acide borique est certainement un avantage à considérer. Enfin le procédé ne paraît pas dénaturant puisque BADIN (1) a constaté que le pouvoir agglutinant du facteur rhumatoïde sur les hématies sensibilisées était conservé.

Il nous est agréable de remercier l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer et l'Institut National d'Hygiène pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. BADIN (J.) - Précipitation rapide et complète de la macroglobuline des rhumatisants chroniques dans une solution d'acide borique. Ann. Biol. clin., (1960), 18, 201-204.
2. BIERRY (H.) - Euglobulines du sérum sanguin. Trav. Memb. Soc. Chim. biol., (1942), 24, 1027-35.
3. EDSALL (J.T.) et WYKAM (J.) - Biophysical chemistry. Vol. I, Academic Press, New-York (1958).
4. GOMBERT (J.) - Contribution à l'étude des anticorps au cours de la Trypanosomiase africaine à T. gambiense. Thèse de Doctorat en médecine, Toulouse 1963, n° 56. Imprimerie Toulousaine ed.
5. KOHN (J.) - Small-scale membrane filter electrophoresis and immuno-electrophoresis. Clin. Chim. Acta, (1958), 3, 450-54.
6. LOŠTICKÝ (C.) - The formation of lipid prealbumin. Clin. Chim. Acta, (1963), 8, 859-67.
7. LOWRY (O.H.), ROSENBROUGH (N.J.), FARR (L.A.) et RANDALL (R.J.) - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem., (1951), 193, 265-75.
8. MASSEYEFF (R.) et GOMBERT (J.) - Recherches sur la nature des globulines anticorps au cours de la trypanosomiase africaine à T. gambiense. Pour paraître in Protides of the Biological Fluids, 11th Colloquium 1963, Elsevier ed. Amsterdam.
9. MATTERN (P.), MASSEYEFF (R.), MICHEL (R.) et PERETTI (P.) - Etude immuno-chimique de la β_2 -macroglobuline des sérums de malades atteints de trypanosomiase africaine à T. gambiense. Ann. Inst. Pasteur, (1961), 101, 382-88.
10. POULIK (M.D.) - Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature, (1957), 180, 1477.
11. SANDOR (G.) - Systèmes globuliniques du sérum et l'immunité. VII. Euglobuline I₁ entité physico-chimique et physico-pathologique. Bull. Soc. Chim. biol., (1951), 33, 1483-96.
12. SANDOR (G.) et SABETAY (Y.) - Le système des globulines peu solubles du sérum. II. Isolement des trois euglobulines à l'état électrophorétiquement presque homogène. Leurs relations avec les γ -globulines et les lipides. Bull. Soc. Chim. biol., (1954), 36, 613-26.
13. SCHEIDEGGER (J.J.) - Une microméthode de l'immuno-électrophorèse. Int. Arch. Allergy., (1955), 7, 103-10.
14. SMITH (I.) - Chromatographic and electrophoretic techniques, tome I, 1 vol., 617 p. N. Heinemann ed. Londres, 1960, p. 62.

15. SMITHIES (O.) - Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins. Adv. Protein Chem., (1959), 14, 65-113.
16. WEICHSELBAUM (T.E.) - An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am. J. clin. Pathol., (1946), 16, 40-49.