R. esp. Fisiol., 13, n.º 1, págs. 59 a 80, 1957

Laboratoire de Chimie Biologique - Faculté de Pharmacie
Paris

Emploi de l'acide phytique pour déterminer les groupes basiques des protéines; application à l'étude des protéines sèriques

par

Jean Emile Courtois*
Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris
Secrétaire Général de la Société de Chimie Biologique

(Recibido para publicar el 16 de marzo de 1957)

Introduction

L'ester hexaphosphorique du mésoinositol (acide phytique) est très largement distribué dans les végétaux. Il peut en être extrait par les solutions acides ; cette extraction est entravée par les protéines végétales associées dans les tissus ; ce fait fut observé par divers auteurs utilisant des matières premières distinctes, LINDENBAUM (1), MNICH (2), PISCHINGER (3), WIAZOWNICKA (4), FONTAINE, PONS et IRVING (5), HELLOT et MACHEBOEUF (6), MATTSON et KOUBLER-ANDERSON (7). Ces auteurs avaient en particulier observé qu'aux alentours de pH 3,0 l'acide phytique n'est que très difficilement extractible par les solutions aqueuses d'acides dilués si l'on se trouve en présence de protéines. L'addition d'acide phytique à une protéine dialysée en diminue la solubilité et il apparaît un précipité de protéine associée à l'acide phytique ; cette combinaison est très insoluble de pH 2,0 à pH 5,0, elle se redissout en présence d'acides concentrés ou en milieu alcalin.

* Conférences présentées en octobre 1956 à Madrid, Institut Espagnol de Physiologie et Biochimie et à Barcelone à l'Institut Français.

En 1949, BOURDILLON (8) sépara des graines de Haricot une fraction protéique qu'il réussit à obtenir sous forme cristallisée ; en 1951 il signala (9) qu'à certains pH cette protéine forme avec l'acide phytique une combinaison cristallisable.

A partir de 1946 nous avons étudié avec RENÉ BARRÉ les protéines des graines d'Amandier.

Dès 1838, ROBIQUET (10) avait signalé la présence de protéines dans le «lait d'amandes» émulsion obtenue en triturant la pâte d'amandes avec de l'eau. Cette émulsion acidifiée donne naissance à un précipité que ROBIQUET dénomma «caséine d'amandes» ; cette désignation fut basée sur les analogies que présentait ce précipité avec la caséine du lait : existence de phosphore sous forme organique, solubilité complète dans l'ammoniaque diluée d'où on la reprécipite en acidifiant par l'acide acétique.

R. BARRÉ (11) (12) (13) a pu montrer que la prétendue caséine d'amandes était en réalité l'association d'au moins deux fractions protéiques distinctes à un dérivé phosphoré qui fut identifié à l'acide phytique. Les deux fractions protéiques furent dénommées 1) amando-albumine et 2) amando-globuline.

1) *L'amando-albumine,* ancienne conamandine d'Osborne, est soluble dans l'eau à pH 7,0, sans addition d'électrolytes, elle est relarguée pour des molarités salines comprises entre 1,55 et 2,18. L'amando-albumine s'est révélée homogène à divers tests : courbes de solubilité, mobilité électrophorétique et ultracentrifugation. Son poids moléculaire est voisin de 150.000.

2) *L'amando-globuline,* ancienne amandine d'Osborne, n'est soluble qu'en présence d'électrolytes ; elle précipite au cours de la dialyse et se trouve relarguée pour une molarité de 1,55 en sulfate d'amonium à pH 7,0 ou en tampon phosphatique de pH 6,5. L'amando-globuline parait comporter au moins deux sous-fractions, l'ensemble présente un poids moléculaire voisin de 300.000.

BARRÉ (14) a déterminé la teneur en différents aminoacides de ces deux protéines ; ils s'y trouvent dans des proportions assez voisines.

TABLEAU I

Amino-acide	Arginine	Histidine	Lysine	Acide aspartique	Acide glutamique	Tyrosine	Tryptophane	Glycine	Sérine	Cystine	Méthionine
Amando-albumine	10,8	2,15	5,7	8,2	23,9	3,1	1,3	3,4	4,5	0,9	0,75
Amando-globuline	9,7	2,0	3,7	8,4	23,6	9,3	1,6	3,0	4,7	0,8	0,7

Les deux fractions protéiques des amandes sont particulièrement riches en amino-acides dicarboxyliques : aspartique et glutamique.

L'acide phytique en milieu acide précipite chacune de ces fractions protéiques ; dans un stade ultérieur de nos recherches nous avons ainsi été amenés à rechercher a) si d'autres dérivés phosphorés précipitaient d'une façon analogue les protéines des amandes et b) si l'acide phytique et les autres dérivés phosphorés expérimentés se comportaient d'une façon analogue avec les protéines d'autres origines.

PRÉCIPITATION DES PROTÉINES PAR LES DÉRIVÉS PHOSPHORÉS EN FONCTION DU *p*H

Ces essais furent réalisés avec seize dérivés phosphorés minéraux ou organiques et avec quatre protéines distinctes : l'une d'origine animale l'insuline, les trois autres d'origine végétale : la légumine : globuline des graines du Pois (*Pisum-sativum*-Légumineuses) - l'amando-albumine et l'amando-globuline des graines d'amandier.

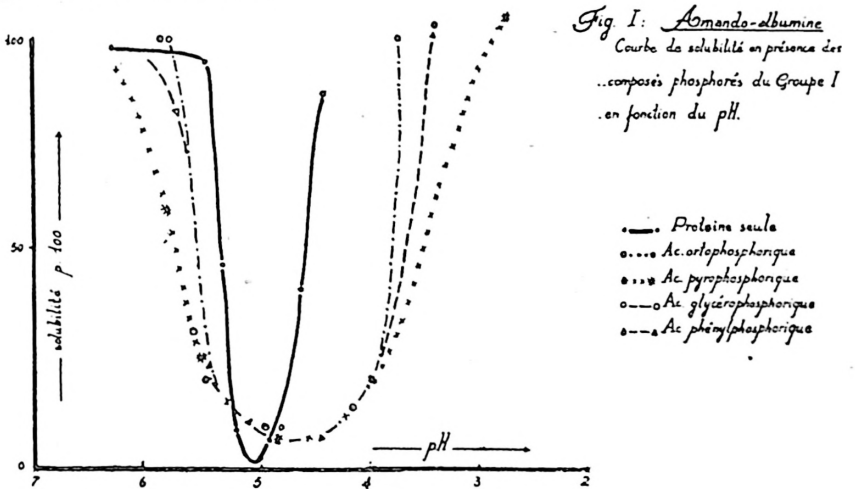


Fig. I : Amando-albumine
Courbe de solubilité en présence des composés phosphorés du Groupe I en fonction du pH.

Les comportements des dérivés phosphorés furent sensiblement identiques avec ces quatre protéines différentes. Les dérivés phosphorés ont ainsi pu être classés, un peu arbitrairement peut-être en deux principaux groupes BARRÉ et COURTOIS (15) (16).

1) Dans le premier groupe figurent les acides orthophosphorique, pyrophosphorique, glycérophosphorique, phénylphosphorique et p. nitrophénylphosphorique.

Au mélange d'une quantité constante de protéine et du sel

de sodium d'un de ces acides, nous ajoutons des quantités croissantes d'acide chlorhydrique. Nous laissons en repos une heure à 0° et centrifugeons pour séparer le précipité ; le pH du liquide surnageant est mesuré ta nous dosons la protéine non précipitée d'après la teneur en azote total de ce liquide minéralisé selon soit le protocole de Kjeldahl, soit d'aprés l'intensité de la réaction colorée xantho-protéique. Par ailleurs le précipité est minéralisésoit par la mélange sulfo-nitrique, soit par une destruction nitro-zincique ; nous déterminons alors la teneur en acide phosphorique qui provient de l'acide phytique précipité avec la protéine.

La figure I indique que les dérivés phosphorés du premier groupe ne modifient que faiblement la courbe de solubilité de la protéine en fonction du pH ; la zone de précipitation est un peu élargie vers les pH acides et, si l'on assimile le point du minimum de solubilité de la protéine à son point isoélectrique, celui-ci est abaissé.

Par ailleurs la teneur en phosphore du précipité protéique demeure assez constante tout au long de la zone de précipitation, elle correspond à une teneur en phosphore de 1,3 à 1,75 p. 100 dans le précipité.

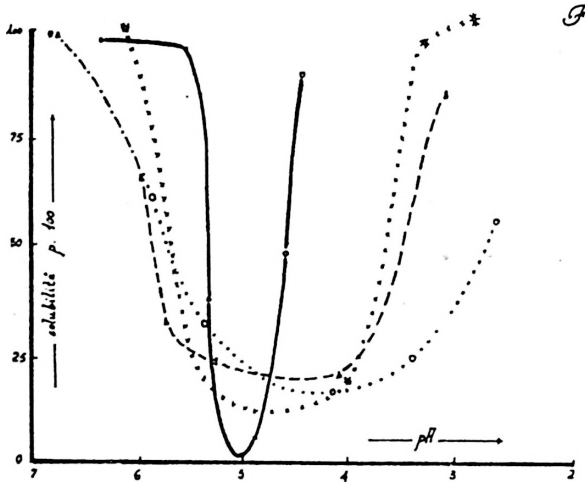


Fig. II : Amande - albumine
Courbe de solubilité en présence des composés phosphorés du Groupe I en fonction du pH.

•—• Protéine seule
··· Ac. saccharosephosphor.
▲--▲ Ac. fructosediphosphor.
o····o Ac. phosphoglycolique

D'autres dérivés phosphorés ont pu être adjoints à ce premier groupe, ce sont les acides saccharosemonorthophosphorique, fructosediphosphorique, phosphoglycolique et morpholinoéthanolphosphorique. La figure II indique que la zone de pH où la protéine se trouve insolubilisée est un peu plus étendue ; si la précipitation débute encore vers pH 6,0, la protéine demeure insolubilisée jusque vers pH 2,5 — 3,0.

L'élargissement de la zone de précipitation rend le point

isoélectrique moins saillant. La teneur en phosphore des précipités est voisine de 1 p. 100.

II)—Dans le second groupe figurent l'ester diphosphorique de la méthyl-2-naphtohydroquinone (synkavit Roche) — les acides inositoltriphosphorique et inositolhexaphosphorique (phytique) — La figure III indique qu'ils fournissent des courbes de solubilité semblables, précipitation en dessous de pH 4,6 devenant presque totale vers pH 3,8. La différence essentielle avec le premier groupe réside surtout dans le fait que les précipités protéiques ne se redissolvent pas jusqu'à des pH

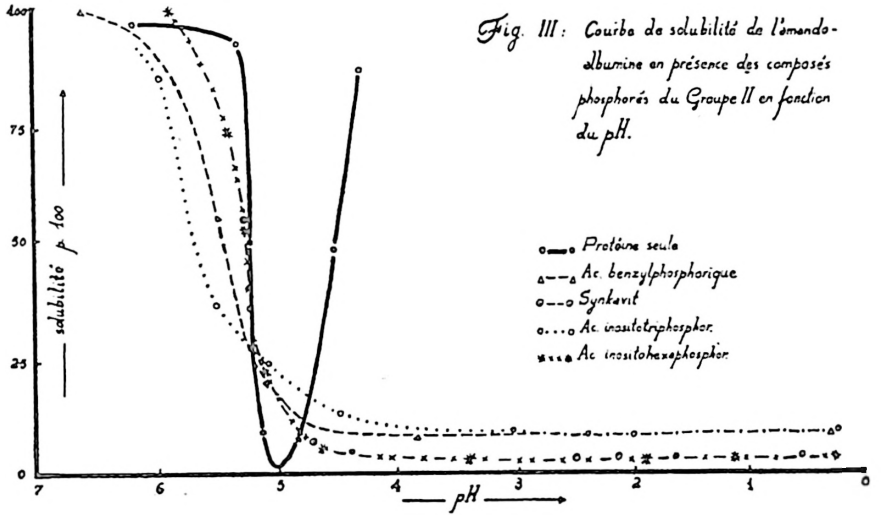
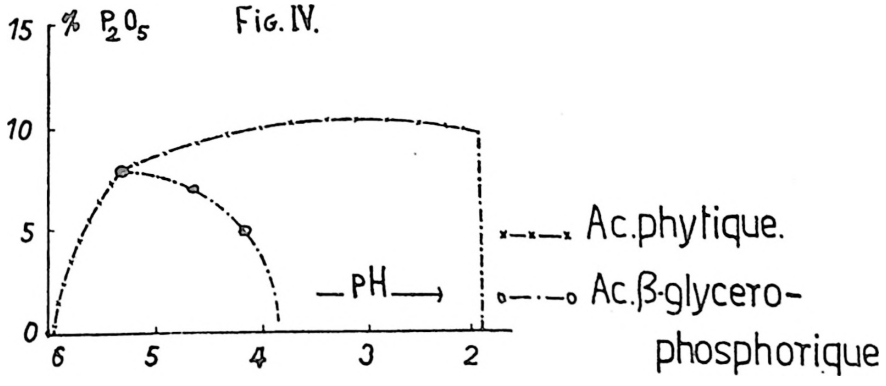


Fig. III : Courbe de solubilité de l'amando-albumine en présence des composés phosphorés du Groupe II en fonction du pH.

très bas, ils ne passent en solution que vers pH 1,0. La proportion de phosphore fixée sur le précipité est nettement plus élevée que pour les dérivés du premier groupe, elle peut atteindre jusqu'à 4 p. 100.

Cette quantité croit pour les corps du deuxième groupe de pH 6,0 à pH 2,5-2,0. Puis elles décroit en-dessous de pH 1,7

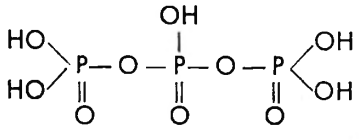


au moment où le précipité est redissous en milieu fortement acide.

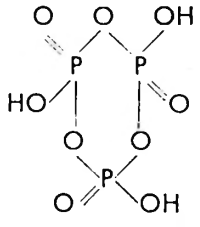
Les figure IV montre la nette différence de comportement avecl'insuline d'un corps du premier groupe (acide glycérophosphorique) et de l'acide phytique du 2ème groupe.

L'acide benzylphosphorique forme la transition entre les deux groupes ce qui montre que notre classification est commode mais un peu arbitraire ; cet acide benzylphosphorique peut-être rangé dans le deuxième groupe avec l'amando- albumine, et dans la dernière partie du premier groupe avec l'amando- globuline et la légumine.

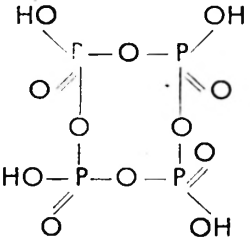
Il était connu depuis longtemps que les acides métaphosphoriques précipitaient les protéines, propriété utilisée pour déféquer les protéines dans les extraits d'organes et les humeurs. Les acides métaphosphoriques sont des mélanges de divers aoides polyphosphoriques du type $(PO_3H)n$ où peut varier de 3 à 30 et plus. J. EBEL qui a fait une série de belles recherches sur les acides polyphosphoriques (17) (18) nous a obligeamment remis divers acides polyphosphoriques définis : l'acide tripolyphosphorique (I) — trimétaphosphorique (II) et tétramétaphosphorique (III).



(I)



(II)



(III)

Ces trois corps, de même que l'acide polyphosphorique dérivant du sel de Graham donnent d'abondants précipités avec les protéines et se classent parmi les composés du deuxième groupe (18).

PROPIÉTÉS COMPARÉES DES COMBINAISONS DES PROTÉINES AVEC L'ACIDE GLYCEROPHOSPHORIQUE ET AVEC L'ACIDE PHYTIQUE

Des essais plus détaillés furent alors réalisés avec un représentant caractéristique de chacun des deux principaux groupes. Nous avons choisi a) l'acide β glycérophosphorique, substrat classique des recherches sur les phosphatases et b) l'acide phytique que avait fourni les combinaisons les plus insolubles et les plus riches en phosphore.

Avec BARRÉ et WORMSER (19) nous avons étudié la structure de l'acide phytique ; les courbes de titration et de conductivité indiquent que l'acide phytique possède quatre fonctions acides trés faibles de pK voisin de 9,7, deux fonctions acides faibles de pK voisin de 6,3 ; ces deux fonctions ont une force semblable à celle de la deuxième fonction de l'acide orthophosphorique. Enfin, l'acide phytique possède six fonctions acides fortes de pK voisin de 1,84 comparables à la première fonction acide de l'acide orthophosphorique.

De pH 4,0 à pH 2,0 la combinaison acide phytique-protéine paraît être assez peu dissociée BARRÉ et COURTOIS (20) : avec une quantité fixe de protéine et des doses variables d'acide phytique la teneur en phosphore du précipité formé n'augmente qu'assez faiblement lorsque l'on fait croître la concentration en acide phytique dans le milieu. La combinaison protéine-acide glycérophosphorique est comparativement beaucoup plus dissociable, ceci se manifeste par une augmentation régulière de la teneur en phosphore du précipité lorsque l'on fait réagir des doses croissantes d'acide glycérophosphorique sur une dose constante de protéine.

En milieu très faiblement acide, à pH 6,5 il n'apparaît pas de déceler de combinaison entre, d'une part l'acide phytique et d'autre part un mélange d'amando-albumine et amando-globuline.

En milieu trèes faiblement acide, à pH 6,5 il n'apparaît pas de précipité si on mélange l'acide phytique et ces deux protéines, cependant l'électrophorèse met en évidence une combinaison où les trois corps sont associés et qui migre comme si elle était homogène. Entre pH 5,0 et 7,0 l'acide phytique associe de même les fractions protéiques du sérum qui vont migrer associées comme si elles ne formaient qu'une seule protéine.

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU SUR LES COMBINAISONS ACIDE PHYTIQUE-PROTEINES

Avec. R. BARRÉ et G. WORMSER (21) nous avons suivi par des mesures conductimétriques et potentiométriques la formation des combinaisons de l'acide phytique avec l'amando-albumine ou la sérum-albumine humaine. Les résultats obtenus permettent de proposer l'interprétation suivante du mécanisme de la précipitation des protéines par l'acide phytique ; tout se passe comme si ce corps se combinait aux groupements basiques ionisables de la protéine (groupes cationiques).

a) En milieu neutre ou faiblement alcalin, où toutes les fonctions acides fortes ou moyennes de l'acide phytique se

trouvent salifiées, il ne paraît pas se former de combinaison avec la protéine.

b) Dans une zone faiblement acide située entre pH 7,0 et le point isoélectrique de la protéine les fonctions acides progressivement libérées du phytate se combinent aux groupes basiques de la protéine, cette combinaison est le plus souvent soluble ou, si elle précipite, assez pauvre en phosphore.

c) En-dessous de pH 4,5 jusque vers pH 2,0 les six fonctions acides les plus fortes de l'acide phytique sont alors mises en liberté, elles viennent salifier les groupes basiques de la protéine.

Ces groupes appartiennent principalement, sinon presque exclusivement, aux bases hexoniques : arginine, histidine et lysine ; l'un de leurs groupements basiques se trouve inclus dans une liaison peptidique tandis que le second est salifiable par l'acide phytique.

L'acide phytique représente le composé phosphoré organique le plus riche en phosphore parmi ceux qui se rencontrent en biochimie ; en effet, chaque atome de carbone y est relié à un atome de phosphore. C'est vraisemblablement cette accumulation de phosphore sur une molécule carbonée qui permet de proposer une interprétation à la grande insolubilité des combinaisons acide phytique- protéines

Les six groupements phosphorés entourant le noyau cyclohexanique de l'inositol vont y agglomérer en les salifiant six groupements basiques de la protéine, cette réunion à la périphérie du noyau provoquera 1) un pliage ou un resserrement des chaînes et hélices polypeptidiques lorsque deux au moins des groupements basiques seront situés dans la même chaîne ou la même hélice.

2) Le rapprochement des séquences polypeptidiques ou leur écartement lorsque l'acide phytique salifiera des groupements basiques appartenant à des chaînes ou hélices distinctes.

Les diverses modifications spatiales de la molécule protéique que l'on peut ainsi concevoir s'accompagneront de la destruction de liaisons intramoléculaires du type hydrogène ; les changements en résultant dans l'architecture de la molécule protéique, joints aux modifications des charges eléctriques par suite de la salification, entraînent l'insolubilisation de la combinaison saline acide phytique-protéine.

d) Lorsque l'acidité augmente en dessous de pH 1,0 á 2,0 la combinaison se redissout, l'acide chlorhydrique concentré déplace l'acide phytique de ses combinaisons et le solubilise tandis que simultanément la protéine passe en solution sous forme de chlorhydrate.

RÉLATIONS ENTRE LES GROUPES BASIQUES ET LES FONCTIONS ACIDES DES DERIVES PHOSPHORES

L'interprétation que nous avons proposée trouve un premier appui dans le fait suivant : les dérivés phosphorés qui ont conduit aux combinaisons les plus insolubles et les plus riches en phosphore possèdent deux ou plusieurs radicaux phosphorés acides. Ils sont ainsi capables d'agglomérer autour de leur molécule plusieurs groupements basiques de la protéine ; c'est en particulier le cas du synkavit et de l'acide inosito-triphosphorique où les noyaux cycliques supportent respectivement deux et trois liaisons monoester orthophosphorique. Les dérivés minéraux cycliques : acides trimétaphosphorique (II) et tétramétaphosphorique (III) constituent également des centres d'agglomération ; l'acide tripolyphosphorique (I) linéaire fournit déjà des combinaisons moins stables avec les protéines que les deux polyphosphates cycliques et représente une transition avec les autres dérivés phosphorés étudiés. Ces divers corps apparaissent également salifier d'une façon analogue les groupements basiques des protéines, mais ils ne possèdent pour la plupart qu'un radical phosphoré par molécule ; dès lors ils ne peuvent rapprocher les groupes basiques et modifier d'une façon aussi accentuée que les dérivés polyphosphorés l'architecture de la protéine. Selon la nature du radical uni à l'acide phosphorique dans le derivé phosphoré il se forme avec les protéines des combinaisons plus ou moins insolubles, d'où toute la variété de comportements observées avec les corps rassemblés dans le premier groupe.

Considérons maintenant non plus la structure du dérivé phosphoré mais celle de la protéine ; l'interprétation que nous avons proposée doit avoir pour conséquence que deux facteurs influeront sur l'insolubilité de la combinaison dérivé phosphoré-protéine, elle sera fonction du poids moléculaire de la protéine et de sa teneur en groupes basiques

1) INFLUENCE DU POIDS MOLECULAIRE. — Une protéine de poids moléculaire élevé subira une plus forte modification de son architecture et sera plus aisément insolubilisée par l'acide phytique, précisément l'acide phytique n'insolubilise pas la gélatine HILL et TYLER (22) la peptone trypsique COURTOIS et BARRÉ (15). BARRÉ (23) a montré que les produits de dégradation de l'édestine par la pepsine n'étaient pas précipités par l'acide phytique, il a proposé de suivre ainsi l'évolution d'une hydrolyse pepsique.

DUMAZERT, GHIGLIONE et BOZZI-TICHADOU (24) ont utilisé

cette propriété pour apprécier l'activité de diverses protéases sur la globine.

Avec Mme. VILLIERS-HUIBAN (25) nous avons étudié systématiquement l'emploi de l'acide phytique pour déterminer l'activité des préparations pharmaceutiques de pepsine. La protéine non dégradée est précipitée par l'acide phytique et dosée selon la technique au biuret ; il est également possible de déterminer volumétriquement l'excès d'acide phytique non précipité dans le liquide surnageant où encore de doser par colorimétrie du biuret les produits d'hydrolyse pepsique non précipitables par l'acide phytique.

2) INFLUENCE DE LA TENEUR EN GROUPES BASIQUES. — La teneur en phosphore du précipité est en relation avec la proportion de groupes basiques. Les protamines sont très riches en arginine et lysine ; bien qu'ayant un faible poids moléculaire elles seront précipitées par l'acide phytique en formant des combinaisons riches en phosphore. BARRÉ, COURTOIS DELRIEU et PERLES (26) ; BARRÉ, COURTOIS et WORMSER (21) ont étudié par détermination des variations de la conductibilité l'influence du pH et de quelques cations bivalents sur la formation des combinaisons de l'acide phytique avec la sérum-albumine, l'amando-albumine, et une protamine : la salmine. Tous les groupements carboxyliques de la salmine sont inclus dans des liaisons peptidiques, il n'existe pas de liaisons intramoléculaires de nature saline entre les carboxyles des acides aspartique et glutamique et des groupements basiques ionisables.

Dans le cas de la salmine à différents pH acides la combinaison avec l'acide phytique présente tous les caractères de la salification d'une base faible par un acide fort. Contrairement à la salmine, l'amando-albumine et l'amando-globuline possèdent des carboxyles reliés par des liaisons salines intramoléculaires à des groupes basiques ionisables.

Avec ces deux protéines des amandes si l'on opère à un pH fixe la combinaison avec l'acide phytique se comporte encore comme la salification d'une base faible par un acide fort. Il n'en est plus de même si le pH varie, le phénomène devenant plus complexe ; en effet, lorsque l'acidité augmente les liaisons salines intramoléculaires entre les carboxyles et les groupements basiques s'ionisent progressivement selon une réaction d'équilibre régie par la loi d'action de masse. Dès lors l'acide phytique devient apte à salifier les groupements basiques au fur et à mesure qu'ils sont déplacés de leurs liaisons avec les carboxyles des acides aspartique et glutamique.

Lorsque l'on opère en présence des chlorures de cations bivalents (calcium et magnésium), l'on observe 1) une redisso-

lution de la combinaison acide phytique-protéine par effet de la force ionique du milieu lorsque la concentration en chlorure métallique s'accroît. 2) une action propre qui n'apparaît pas avec la salmine mais se manifeste avec les deux albumines, les cations diminuant le taux d'acide phytique combiné. Il apparaît que les cations Ca^{++} et Mg^{++} bloquent les liaisons intramoléculaires entre les carboxyles et les groupes basiques et il se forme des complexes métalliques ; les groupes basiques ainsi stabilisés ne peuvent plus être salifiés par l'acide phytique.

Déterminations des groupes basiques ionisés des protéines

La stabilité des combinaisons acide phytique-protéines nous a permis de mettre au point une méthode simple et pratique de détermination des groupes basiques des protéines.

I) *Calcul;* — C'est vers pH 2,5 que le précipité acide phytique-protéine atteint le maximum de sa teneur en phosphore ; nous avons pu montrer que dans ces conditions chacune des six fonctions acides les plus fortes de l'acide phytique salifie un groupe basique de la protéine. De ce fait une molécule d'acide phosphorique estérifié, correspondant à 31 g de phosphore, est unie à un groupe basique.

Il est d'usage de rapporter le nombre de groupes basiques à une protéine d'un poids moléculaire conventionnel de 100.000, soit 10^5 g. Si 1 g de protéine insolubilisée est combinée à a millig. de phosphore phytique le rapport $\frac{a \times 10^2}{31}$ correspondra au nombre de groupes basiques d'une protéine de poids moléculaire 100.000.

II) *Résultats.* — Nous avons tout d'abord pu vérifier (20) qu'avec l'amando-albumine, l'amando-globuline et l'insuline le nombre de groupes basiques évalué d'après la proportion de phosphore phytique combiné dans le précipité était pratiquement identique à celui établi d'après les courbes de titration potentiométrique de ces protéines, méthode de titration longue et délicate.

Dans le Tableau II nous indiquons les valeurs obtenues en déterminant par l'acide phytique le nombre de groupes basiques des diverses fractions protéiques du plasma humain ; ces valeurs sont en excellent accord avec celles établies par d'autres méthodes Haurowitz (27) Tristram (28).

L'examen de ce tableau montre que les diverses fractions du plasma se classent d'après leur richesse en groupes basiques dans l'ordre progressif suivant 1) mélange des diverses fractions

globuliniques 2) β lipoprotéines, l'échantillon analysé renfermait 6 p. 100 de sérum-albumine, 5 p. 100 d'α globuline, 68 p. 100 de β_1 lipoprotéines, 16 p. 100 de β_2 lipoprotéines, 5 p. 100 de γ globulines et fibrinogène, 3) α_1 lipoprotéines, échantillon constitué de 9 p. 100 de sérumalbumine, 60 p. 100 d'α globulines, 26 p. 100 de β globulines, 0,4 p. 100 de γ globulines et 4,4 p. 100 de cholestérol, 4) fibrinogène et 5) sérum-albumine.

TABLEAU II

Détermination du nombre des groupes azotés basiques ionisables pour 10^5 g de fraction protéique du plasma humain

Nature de la fraction	Valeur calculée d'après la teneur en acide phytique du précipité	Valeurs obtenues par d'autres méthodes d'après HAUROWITZ (32) et TRISTRAM (49)
Sérum-albumine	146	142
Sérum-globuline	102	100
Fibrinogène	123	125
α_1 lipoprotéines (fraction IV de Cohn)	113	
β lipoprotéines (fraction II de Cohn)	107	

APPLICATIONS À L'ÉTUDE DES PROTÉINES SÉRIQUES EN CHIMIE CLINIQUE

Ces recherches furent réalisées en collaboration avec. R. BARRÉ, P. DELRIEU et R. PERLES (26) (29 (30). Il fut tout d'abord possible d'observer qu'à pH 2,5 en une heure à la glacière l'acide phytique insolubilise la totalité des protéines sériques ; la quantité de protéines précipitée est évaluée en multipliant par le coefficient habituellement utilisé de 6,25 la teneur en azote total déterminé par Kjeldahlisation. La précipitation phytique conduit à des valeurs pratiquement identiques à celles obtenues à partir des mêmes sérums en utilisant la méthode pondérale après thermocoagulation en présence d'éthanol de FLEURY, COURTOIS et EBERHARD (31) (32).

La teneur en phosphore phytique du precipité protéique permet de déterminer le nombre Nb de groupes basiques pour 10^5 g de protéine, soit un poids moléculaire moyen de 100.000. N_b sera function des proportions respectives d'albumines ($N_b = 142$) et de globulines ($N_b = 100$). Nous déterminons ce rapport par électrophorèse sur papier et révélation avec une solution alcoolique de bleu de bromophénol et bromothymol additionnée de chlorure

mercurique. Nous procédons alors à l'appréciation colorimétrique de l'intensité des diverses taches protéiques.

Si a représente le pourcentage des albumines et b celui des diverses globulines (a + b = 100), lorsque ces protéines auront une teneur normale en groupes basiques, la valeur du N_b sera

$$N_b = \frac{a \times 142}{100} + \frac{b \times 100}{100} = 1{,}42\ a \times b$$

Nous avons donc comparé les valeurs de N_b *trouvé* d'après la teneur en phosphore phytique du précipité à celles du N_b *calculé* d'après les pourcentages respectifs d'albumines et globulines.

1) *Sérums de sujets sains.* — Dans le tableu III se trouvent rassemblés quelques résultats obtenus avec les sérums de sujets sains des deux sexes et d'âges variables.

TABLEAU III

Groupes basiques des protéines de sujets présumés normaux

Protéines totales (en g. par litre)	72	85	72	76	70	69
N_b calculé d'après le rapport albumines/globulines . .	122	122	124	125	125	126
N_b trouvé d'après la teneur en phosphore du précipité acide phytique-protéines.	123	124	123	121	125	123

Dans l'ensemble de nos essais, chez les sujets sains, on note rarement plus de 5. p. 100 d'écart entre les valeurs de N_b calculé et trouvé. Un effort violent comme l'accouchement ne modifie pas la valeur de N_b calculé ou trouvé. La conservation du sérum pensant 1 à 2 jours à la glacière est sans influence sur N_b, après plusieurs semaines on observe une augmentation minime mais régulière de N_b, augmentation provoquée sans doute par l'action des protéases sériques.

2) *Sérums de sujets atteints de diverses affections.* — Dans certaines affections il existe de très nets écarts entre les valeurs de N_b calculé et trouvé.

Dans le Tableau IV figurent les résultats obtenus avec des sérums présentant le même pourcentage d'albumines dans les protéines totales, de plus les proportions des diverses globulines sont assez voisines. La valeur de N_b calculé avec 40 p. 100 d'albumines et 60 p. 100 du mélange des globulines sera donc de 117 pour chacun des trois sérums.

TABLEAU IV

Teneur en groupes basiques des protéines de trois sérums pathologiques possédant les mêmes proportions respectives d'albumines et globulines

Affection	Protéines totales (en g. par litre)	Pourcentage des diverses fractions protéiques					N_b	
		Albumines	Globulines				Calculé d'aprés le rapport albumines/globulines	Trouvé d'aprés la teneur en phosphore du precipité
			α_1	α_2	β	γ		
Hépatite	70	40,0	12,5	12,5	14,0	21,0	117	87
Ictère infectieux	71	40,0	10,0	12,0	16,0	22,0	117	129
Ictère cirrhogène	86	40,0	12,5	12,5	10,0	25,0	117	244

L'acide phytique nous permet de fixer un N_b trouvé de 87 chez le sujet atteint d'hépatite, ce qui paraît traduire une nette diminution des groupes basiques. En effet N_b trouvé est inférieur au minimum de 100 correspondant théoriquement à un sérum ne renfermant que des globulines. Dans l'ictère infectieux N_b est de 129, taux légèrement supérieur à la normale.

L'augmentation de ces groupes basiques est extrêmement accentuée dans l'ictère cirrhogène où N_b s'est élevé à 244 ; le

TABLEU V

Détermination des groupes basiques des protéines sériques dans diverses affections

Nature de l'affection	Protéines totales (en g. par litre)	N_b	
		Calculé d'aprés le raport albumines/globulines	Trouvé d'aprés la teneur en phosphore et azote du précipité acide phytique protéine
Ictère infectieux	78,0	116	127
Stéatose hépatique d'origine éthylique	74,5	122	142
Stéatose hépatique d'origine éthylique	73,0	120	140
Rhumatisme articulaire aigu, début	56,0	115	163
Rhumatisme articulaire aigu, début	84,0	117	160
Septicémie à perfringens, issue fatale	52,0	123	176
Septicémie à perfringens, issue fatale	55,0	120	167
Néphrose lipoïdique	40,0	110	94
Néphrose lipoïdique	46,0	113	90
Néphrite.	60,0	119	106
Hépatite	72,0	113	98
Epithélioma de la langue . .	72,5	115	97
Epithélioma des bronches . .	74,5	120	94
Cirrhose hypertrophique sans ascite	76,5	113	93
Cirrhose hypertrophique sans ascite	68,0	119	114
Sarcome de l'amygdale . . .	65,0	124	129
Maladie de Kahler	123,0	108	103
Ethylisme peu accentué . .	68,0	120	113

maximum théorique pour un sérum qui ne renfermerait que des albumines serait $N_b = 142$.

Su 66 sérums étudiés, dont quelques uns des résultats sont groupés dans le tableau V, 36 ont permis d'observer des écarts supérieurs à 10 p. 100 entre les valeurs de N_b calculé et trouvé. N_b trouvé est inférieur à 100 pour 9 sérums et dépasse 142 dans 11 autres.

En formulant toutes les réserves qui s'imposent par suite du nombre limité d'échantillons analysés, il est cependant permis de signaler qu'une augmentation des groupes basiques combinables à l'acide phytique s'est manifestée dans les ictères infectieux, la stéatose hépatique d'origine éthylique, le rhumatisme articulaire aigu et la septicémie à perfringens.

Une diminution de ces groupes s'observe dans la néphrose lipoïdiques, les néphrites, les hépatites, les épithéliomas de la région rhino-bucco-pharyngée et une partie des cirrhoses hypertrophiques.

Nous n'avons jusqu'ici pu relever de différences bien accentuées entre les valeurs de N_b calculé et trouvé dans un sarcome de l'amygdale, trois cas de maladie de Kahler et l'éthylisme peu accentué.

Cet ensemble de résultats permet d'envisager que l'emploi de l'acide phytique pour déterminer les groupes basiques des protéines sériques est susceptible de fournir un test précieux de chimie clinique.

Il paraît utilisable non seulement pour faciliter le diagnostic d'une affection mais aussi pour en contrôler l'évolution. Une série de déterminations sur un enfant atteint de néphrose lipoïdique indiquent que la diminution du N_b trouvé a coïncidé avec les crises aigües, tandis qu'une valeur normale ou supérieure à la normale, allait de pair avec une amélioration de l'état général.

Par ailleurs, quelques déterminations ont montré que le traitement radiologique des épithéliomas de la région rhino-bucco-pharyngée s'accompagnait d'une augmentation des groupes basiques. Tandis qu'avant ce traitement N_b trouvé était nettement inférieur à N_b calculé, après traitement les écarts deviennent minimes et parfois même N_b trouvé devient supérieur à N_b calculé.

De même les différences entre N_b calculé et trouvé sont plus accentuées au début d'une crise de rhumatisme articulaire aigu qu'après traitement ; ils sont également plus accentués dans deux cas de septicémie à perfringens, suivis d'issue fatale que dans la même affection suivie de guérison.

Teneur en groupes basiques des diverses fractions protéiques du sérum

Arrivés à ce stade de nos recherches il devenait nécessaire de chercher à préciser quelles fractions protéiques du sérum subissaient des variations de leur teneur en groupes basiques. C'est ce qu'a entrepris P. Delrieu (33) (34) sous ma direction (1). Les diverses fractions protéiques du sérum furent séparées par électrophorèse sur papier. Un même échantillon de sérum est réparti sur toute une série de feuilles soumises à l'électrophorèse ; les bandes correspondant à la même fraction protéique sont découpées des diverses feuilles, la protéine est éluée par une solution de chlorure de sodium à 9 p. 100.

La précipitation phytique de faibles quantités de protéines a nécessité l'emploi de microméthodes de dosage du phosphore et de l'azote. Dans le tableau VI nous indiquons les valeurs des N_b des fractions protéiques de sujets normaux. Ce nombre de groupes basiques rapportés à 10^5 g. de protéine est en moyenne chez les sujets normaux de : 143 : sérum-albumine, 122 : α_1 globuline, 80 : α_2 globuline, 123 : β globuline et 90-100 : γ globulines.

TABLEU VI

N_b des fractions protéiques de sujets normaux

Sujets	Femme (21 ans)	Femme (23 ans)	Homme (35 ans)	Garçon (12 ans)	Fille (9 ans)	Fille (10 ans)	Fille (15 ans)	Homme (35 ans)	Femme (21 ans)
Sérum-albumine	142	145	143	140	140	138	145	147	143
α_1 globuline	118	120	126	123,5	124	121	122	120	124
α_2 globuline	80	76	85	77,5	82	75	75,5	81	80
β globuline	125	127	125	127	121	121	125	121	118
γ globuline	98	101	99,5	87	90	87,5	95	103	99,5

Dans l'ensemble les variations individuelles du N_b sont assez minimes, elles sont par contre notables dans diverses affections pathologiques. Dans le Tableau VII nous indiquons les résultats obtenus avec six sérums de malades atteints de néphro-

(1) Les résultats indiqués dans la dernière partie de cette revue ont pu être obtenus avec l'appui d'une subvention pour la Recherche Médicale versée par la Sécurité Sociale sous le contrôle de l'Institut National d'Hygiène.

TABLEAU VII

Variations des N_b des differentes fractions protéiques du sérum dans la néphrose lipoïdique

Sujet	N.° 111* Garçon 10 ans		N.° 112 Garçon 10 ans		N.° 113 Garçon 10 ans		N.° 114 Garçon 12 ans		N.° 115 Fille 8 ans		N.° 116 Fille 15 ans	
Protéinurie (en g. par litre)	18,0		45,0		Traces		0,20		4,0		8,0	
Fractions	% **	N_b	%	N_b	%	N_b	%	N_b	%	N_b	%	N_b
Sérum-albumine	18	101	18	108	39	140	30	141	40	126	30	120
α_1 globuline	2,5	104	3,5	97,5	3,0	117	4,5	125	2,0	99	3,0	100
α_2 globuline	42,0	102	41,0	91	31,0	78	33,5	81	30,0	87	40,0	90
β globuline	32,5	117,5	31,0	110	19,0	119	12,0	120	20,0	102	20,0	113
γ globuline	5,0	94,5	6,5	100	8,0	102	20,0	103	8,0	101	7,0	95

* Les N.os 111, 112 et 113 portent sur les même sujet à différentes étapes de la maladie
** Pourcentages obtenus par électrophorèse sur papier.

TABLEAU VIII

Variations du N_b des differentes fractions protéiques du sérum dans le rhumatisme articulaire aigu

Sujet	N.° 117 Homme 50 ans		N.° 118 Garçon 15 ans		N.° 119 Garçon 11 ans		N.° 120 Garçon 12 ans		N.° 121 Garçon 8 ans		N.° 122 Garçon 13 ans	
Etat pathologique	Etat rhumatismal chronique		Crise aigüe		Crise aigüe		8 jours après une crise, traitement		20 jours après une crise, traitement		Maladie de Brouillaud, traitement depuis 1 mois	
Fractions	%	N_b	%	N_b	%	N_b	%	N_b	%	N_b	%	%
Sérum-albumine	52	150	40	162	49	160	52	139	48	147	44	115
α_1 globuline	3,0	111	7,0	90	5,0	77,5	3,0	86,5	4,0	115	4,0	78,5
α_2 globuline	11,0	88,5	13,0	91	11,0	95	13,0	101	15,0	90	18,0	113
β globuline	14,0	128	15,0	106	13,0	108	14,0	97,5	13,0	108	14,0	157
γ globuline	20,0	109	25,0	120	22,0	121	18,0	94,5	20,0	97,5	20,0	102

Légende: Voir tableau VII.

se lipoïdique. Les trois premiers (références 111-112 et 113) proviennent du même sujet à différents stades de la maladie. Les trois autres proviennent de malades différents, à des stades d'évolution correspondant à la teneur en protéines des urines.

Les γ globulines dont le pourcentage tend à diminuer au fur et à mesure que le degré de l'affection augmente ont un N_b qui semble demeurer assez constant et identique à celui des γ globulines d'une sérum normal.

On note par contre une très nette diminution du N_b de la sérum-albumine, des α_1 et β globulines ; cette diminution est d'autant plus importante que la protéinurie est plus élevée. Chez le sujet 113 cette protéinurie est minime et chez le sujet 114 elle a disparu ; les proportions respectives des fractions protéiques demeurent anormales mais les N_b de ces diverses fractions ont des valeurs peu différentes de celles observées chez les sujets normaux.

Par contre le N_b de l'α_1 globuline augmente légèrement.

Il ne s'agit peut-être que d'une coïncidence pour ces quelques cas de néphrose lipoïdique, mais il est permis de signaler que le N_b de toutes les fractions varie en tendant à se rapprocher d'un N_b voisin de 100.

Dans le rhumatisme articulaire aigu (tableau VIII) l'on observe une augmentation du N_b des γ globulines ; cette augmentation se manifeste lors des crises aigües et disparaît après traitement de l'affection.

Le N_b de la sérum-albumine s'élève lors des crises.

Quelques essais furent également realisés sur des sérums de malades atteints d'ictères à virus. L'on note une très nette augmentation du N_b des γ globulines qui s'élève jusqu'à 130-138 ; un abaissement du N_b des β globulines et de la sérum-albumine.

Il est encore prématuré de tirer des conclusions générales à partir de quelques sérums à divers stades des affections ; de telles conclusions exigent un nombre d'expériences plus étendu.

Ce qui ressort par contre indiscutablement de nos résultats (tableaux VII et VIII) c'est que la teneur en groupes basiques des fractions protéiques du sérum peut varier de façon très accentuée dans les états pathologiques alors qu'elle manifeste une relative stabilité chez les sujets normaux.

Dans l'état actuel de nos recherches il est impossible d'en tirer des déductions plus précises.

Nous poursuivons d'ailleurs nos essais en vue de rassembler un plus grand nombre de résultats à partir de sérums pathologiques : détermination du N_b des diverses fractions et aussi dosage des amino-acides basiques : lysine-arginine-histidine, dont la teneur paraît être en relation avec le N_b de la protéine.

Conclusions

Le test à l'acide phytique fournit une méthode relativement simple pour déterminer un caractère quantitatif des protéines. La teneur en phosphore du précipité acide phytique-protéine permet de calculer le nombre de groupes basiques N_b d'une protéine ; ces groupes basiques étant salifiables par les six fonctions acides les plus fortes de l'acide phytique.

Le N_b des fractions protéiques du sérum est relativement fixe chez les sujets sains, l'on note des augmentations ou diminutions très accentuées du N_b dans de nombreuses affections.

Bibliographie

(1) LINDENBAUM (S.). : *Bull. Int. Ac. Pol. Sc. et Let.* 1926, 1041.

(2) MNICH (E) : *Bull. Int. Ac. Pol. Sc. et Let.* 1926, *B*, 123.

(3) PISCHINGER (E.) : *Bull. Int. Ac. Pol. Sc. et Let.* 1931, *B*, 123.

(4) WIAZOWNICKA (H.) : *Bull. Int. Ac. Pol. Sc. et Let.* 1933, 107.

(5) FONTAINE (T. D.), PONS (W. A.) et IRVING (G. W.) : *J. Biol. Chem.* 1946, **164**, 487.

(6) HELLOT (R.) et MANCHEBOEUF (M.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1947, **29**, 817.

(7) MATTSON (S.) et KOUBLER-ANDERSON (E.) : *Ann. Rep. Agr. Coll.* SWEDEN, 1947, **14**, 290.

(8) BOURDILLON (J.) : *J. Biol. Chem.* 1949, **180**, 553.

(9) BOURDILLON (J.) : *J. Biol. Chem.* 1951, **189**, 65.

(10) ROBIQUET : *Jl. Pharm. et Chim.* Brocés-verbal de la Société de Pharmacie du 7 Mars 1838.

(11) BARRÉ (R.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1951, **33**, 1473.

(12) BARRÉ (R.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, **35**, 899.

(13) BARRÉ (R.) : *Th. Doct. Sc. Phys.* Paris, 1953.

(14) BARRÉ (R.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, **35**, 907.

(15) COURTOIS (J. E.) et BARRÉ (R.) : *Bull. Soc. Biol.* 1949, **31**, 740.

(16) COURTOIS (J. E.) et BARRÉ (R.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, **35**, 913.

(17) EBEL (J. P.) : *Th. Doct. Sc. Phys.* Strasbourg, 1951.

(18) EBEL (J. P.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1952, **34**, 321-330-491 et 498.

(19) BARRÉ (R.), COURTOIS (J. E. et WORMSER (G.) : *Buc. Soc. Biol.* 1954, **36**, 455.

(20) BARRÉ (R.) et COURTOIS (J. E.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, **35**, 921.

(21) BARRÉ (R.), COURTOIS (J. E.) et WORMSER (G.) : *Ann. Acad. Sci. Fenn.* Ser AII, Chemica N.° 60, p. 104-233 (1955).

(22) HILL (R.) et TYLER (C.) : *J. Agric. Sc.* 1954, **44**, 324.

(23) BARRÉ (R.) : *Ann. Pharm. Fr.* 1956, **14**, 182.

(24) DUMAZERT (C.), GHIGLIONE (C.) et BOZZI-TICHADOU (M.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1954, **38**, 403.

(25) COURTOIS (J. E.) et VILLIERS-HUIBAN (H.) : *Ann. Pharm. Fr.* 1956, **14**, 639.

(26) BARRÉ (R.), COURTOIS (J. E.), DELRIEU (P.) et PERLES (R.) : *Ann. Pharm. Fr.* 1954, **12**, 601.

(27) HAUROWITZ (F.) : Chemistry and Biology of proteins p. 32 - Academic Press New York, 1950.

(28) TRISTRAM (G. B.) : The amino-acid composition of proteins in NEURATH (H.) et BAILEY (K.) - The proteins -Ière partie p. 224 - Academic Press -New York, 1933.

(29) BARRÉ (R.), COURTOIS (J. E.) DELRIEU (P.) et PERLES (R.) : *Ann. Biol. Clin.* 1954, **12**, 501.

(30) BARRÉ (R.), COURTOIS (J. E.), DELRIEU (P.) et PERLES (R.) : *Ann. Biol. Clin.*, 1955, **13**, 269.

(31) FLEURY (P.) : COURTOIS (J. E.) et EBERHARD (Melle R.) : *Ann. Biol. Clin.* 1951, **9**, 512.

(32) FLEURY (P.), COURTOIS (J. E.) et EBERHARD (Melle R.) : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1951, **33**, 1900.

(33) DELRIEU (P.) : *Ann. Biol. Clin.* 1957, **15**, 11.

(34) DELRIEU (P.) : *Ann. Biol. Clin.* 1957, **15**, 28.