

de la molécule, une fois séparée de la protéine, n'est pas réducteur¹). Les ponts pyraniques sont donc stables et aucune fonction —OH en position 5 n'est libre.

5° L'ensemble de ces remarques suggère que le formol prenant naissance au cours de l'oxydation périodique de la gélatine, provient de la scission des chaînes latérales apportées par l'hydroxylysine, les deux fonctions —NH₂ et —OH (δ et ϵ) étant libres dans la protéine en question.

6° Remarquons enfin que nos résultats incitent à penser que l'hydroxylysine fait réellement partie de la molécule de gélatine et n'est pas, comme on pourrait le croire, un artefact prenant naissance au cours de son hydrolyse.

Marseille, Laboratoire de Chimie biologique
de la Faculté des Sciences.

165. Formule glycoprotéidique du plasma sanguin

par M.-F. Jayle et O. Judas.

(31 V 46)

Dans ce travail, nous avons eu pour objectif de préciser la localisation du sucre polyholosidique de plasmas et de sérums normaux et pathologiques, et, en superposant sa répartition à celle de l'azote protéique, d'établir une nouvelle classification des protéines sériques utilisable en clinique et mieux adaptée aux acquisitions récentes de la biochimie.

Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de fractionnement de *Cohn* par un mélange équimoléculaire de phosphates mono- et bi-potassiques et nous nous sommes référés pour le choix des molarités salines à l'excellent travail de *Y. Derrien*²), réalisé à l'École de *J. Roche*.

Pour le dosage du sucre protéidique, nous avons adapté la méthode colorimétrique à l'orcinol de *Sørensen* et *Haugaard*³) à l'électrophotomètre de *Meunier* et nous l'avons simplifiée et sensibilisée. Le sucre protéidique a été traduit en galactose, mannose et glucosamine (G.M.G.) et le sucre libre en glucose.

Trente-quatre plasmas ou sérums normaux et pathologiques ont été étudiés. La plupart n'ont été séparés qu'en trois ou cinq fractions: globuliniques, albuminiques et défécate trichloracétique (DT). Douze sérums ou plasmas ont été séparés en 12 ou 14 fractions.

¹) *Neuberger, A.*, *Biochem. J.* **32**, 1435 (1938).

²) *Derrien, Y.*, *Bl. Soc. Chim. biol.* **26**, 1091 (1944).

³) *Sørensen* et *Haugaard*, *C. r. Lab. de Carlsberg* **19**, 1 (1933).

I.

*Teneur en polyholosides des différentes fractions plasmatiques ou sériques.**1^o Sérums de chevaux.*

Deux sérums de chevaux ont été fractionnés aux molarités 1, 1,5, 1,7, 1,9, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 et 3. Le sucre libre a été dosé par la méthode de *Hagedorn-Jensen*.

La répartition du sucre dans le sérum de cheval est très particulière, en ce sens qu'on en trouve la plus grande partie dans la fraction albuminique alors que les globulines en sont très pauvres, à l'exception de la première fraction qui précipite entre 0 et 1 M. Le sucre albuminique présente un maximum entre les molarités 2,2 et 2,3 et est ensuite réparti irrégulièrement jusqu'à la fin de la précipitation des albumines. La courbe se relève nettement entre 3 M et DT, le pourcentage atteignant alors 23,4 et 38,7%. Le rapport moyen sucre albuminique/sucre globulinique sur 4 sérums étudiés est égal à 2,1. On comprend pourquoi *Hewitt* a retiré des albumines de cheval le globoglycoïde et le séroglycoïde qui sont en fait des globulines α et β .

2^o Sérums et plasmas humains.

L'étude a porté sur 28 sérums et plasmas de sujets normaux; 10 d'entre eux ont été soumis à de multiples fractionnements au phosphate de potassium.

a) De 0 à 0,75 M ne précipitent d'une façon inconstante dans le cas du sérum que des traces d'une globuline que nous dénommons macroglobuline, car elle représente sans doute les protéines d'un poids moléculaire de 900 000 que l'on retrouve dans le diagramme de l'ultracentrifugation. Son taux moyen normal est inférieur à 1 gr. Cette fraction est beaucoup plus importante dans le plasma, où elle s'additionne au fibrinogène, et son taux moyen passe à 5,37 gr. Si nous ne tenons pas compte de la macroglobuline, nous constatons que la teneur en hydrates de carbone de cette fraction chez le sujet normal est de 10 à 14%. On peut en déduire que le fibrinogène est un mucoprotéide, car ce polyholoside le suit fidèlement au cours de sa précipitation et on ne peut obtenir l'un sans l'autre. Aussi avons-nous été surpris de le retrouver dans la fraction 0,75 du sérum normal à un taux qui est voisin de celui du plasma. Il est relativement fixe d'un sérum à l'autre, contrastant par là avec les variations considérables de la macroglobuline. Dans le sérum normal il est pondérablement aussi important que la protéine précipitée, et tout cela exclut la possibilité d'une combinaison glycoprotéidique. Nous sommes donc amenés à considérer qu'il s'agit dans le sérum d'un polyholoside libre que nous dénommons mucoïde F; sans doute se détache-t-il du fibrinogène au moment de sa transformation en fibrine. Cette façon de voir pourrait conduire à reconsidérer sous un angle nouveau le mécanisme d'action de la thrombine.

Dans les sérums de tuberculeux évolutifs, il n'y a pas d'augmentation notable du mucoïde F, alors que la concentration de la macroglobuline augmente considérablement atteignant 5 gr. en moyenne. Nous ne pouvons pas encore affirmer que cette augmentation est caractéristique de la tuberculose, car nous manquons d'informations en pathologie générale.

b) *Fraction 0,75 à 1,25 M.* Il se produit ici une solution de continuité dans la courbe de précipitation saline et celle-ci nous paraît très caractéristique du plasma normal; un seul cas fait exception à cette règle qui n'est pas mise en défaut chez les tuberculeux.

c) *Fraction 1,25 à 1,5 M.* Dans cette zone floccule une globuline qui, pour les sujets 18, 22, 26 et 27, est soit totalement dépourvue, soit très pauvre en hydrates de carbone. Il est important d'insister sur l'existence d'une globuline de nature exclusivement protéidique qui, le plus souvent, floccule à ce niveau et plus rarement entre 1,5 et 1,70 M.

d) *Fraction 1,50 à 1,70 M.* Il existe ici des variations individuelles; le plus souvent la protéine de cette fraction est pauvre en glucides, que ce soit chez le sujet normal ou chez le sujet pathologique; parfois même elle n'en contient pas du tout. Nous en tirons la conclusion que les hydrates de carbone décelés entre 1,25 et 1,70 M ne font pas partie

de la globuline γ qui en serait dépourvue. Cette interprétation est exploitée pour l'évaluation du taux de cette protéine dans la formule que nous établirons plus loin.

e) *Fraction 1,70 à 2,45 M.* Pour *Derrien*¹⁾, la frontière entre les albumines et les globulines se situe à la molarité 2,17. Nous avons adopté cette ligne de démarcation en arrondissant ce chiffre à 2,2. Chez le sujet normal, c'est à ce niveau (1,7 à 2,2) que dans la plupart des cas se retrouve la fraction la plus riche en hydrates de carbone; elle coïncide rigoureusement avec la zone de précipitation de l'haptoglobine qui, chez l'homme, est dans 8 cas sur 10 une globuline homogène comme nous l'avons montré avec *P. Gillard* dans un travail en cours de rédaction, alors que chez le cheval elle se comporte comme une albumine qui se confond avec le séroglycoïde d'*Hewitt* (*M.-F. Jayle* et *Abdellatif*²⁾); cependant dans 2 cas sur 10 de sérum humain, l'haptoglobine floccule avec les albumines, et c'est pourquoi on retrouve alors la concentration maximum en sucre protéidique entre 2,2 et 2,45 M. On peut en déduire qu'il existe deux types de sérums humains normaux: les uns où les glycoprotéides se localisent principalement dans la partie terminale des globulines, les autres, plus rares, où ils se retrouvent dans la fraction initiale des albumines qui néanmoins, dans tous les cas, a une teneur appréciable en hydrates de carbone. Les travaux de *Blix*³⁾ nous apprennent que les globulines α et β ont une teneur en hydrates de carbone voisine de 10% et ceux d'*Hewitt* et de *McMeekin* qu'on en retrouve une portion notable dans les albumines. Nous avons personnellement observé que la molarité 2,45 représentait chez l'homme la ligne de démarcation entre les albumines riches en hydrates de carbone et celles qui en sont pratiquement dépourvues. Nous en concluons que les globulines α et β précipitent entre 1,7 et 2,45 M et que la position de leur densité maximum en fonction de la molarité saline dépend du type du sérum étudié, mais surtout de son état pathologique. En effet, dans les sérums pathologiques et en particulier tuberculeux, les globulines s'appauvrissent alors que les albumines s'enrichissent en sucre lié. Le rapport sucre albuminique/sucre globulinique est en moyenne de 0,64 chez les normaux et atteint 5,13 chez les tuberculeux. Cela est dû en partie à la migration des globulines et de la phase globulinique vers la phase albuminique. Or, l'haptoglobine précipite là encore le plus souvent avec les globulines, aussi donnons-nous avec *P. Gillard*⁴⁾ l'interprétation suivante à ce phénomène de migration: quand on combine l'haptoglobine (Hp) de type globulinique à de l'hémoglobine (Hb), on retrouve le complexe Hp-Hb dans les albumines. Cette modification de la constante de précipitation saline de l'haptoglobine se produit sans doute chaque fois que l'haptoglobine se combine à de l'hémoglobine, des pigments, des toxines ou d'autres substances issues de la désintégration tissulaire. C'est ce qui explique que le sucre protéidique a tendance à pénétrer dans la zone albuminique au cours de syndromes infectieux ou toxiques et cela sans qu'on observe une augmentation importante des glucides liés entre les molarités 1,70 et 2,45, puisque leur taux moyen passe de 0,98 g chez les sujets normaux à 1,26 g chez les tuberculeux évolutifs.

Nous considérons que l'haptoglobine est destinée à fixer et à neutraliser les toxines circulantes. Mais comme il n'existe aucune proportionnalité entre le taux de l'haptoglobine et celui des glycoprotéides de 1,7 à 2,2 M (zone de précipitation la plus fréquente de l'haptoglobine humaine), nous sommes obligés d'admettre que, dans un premier temps du processus de détoxication humorale, l'haptoglobine résulte de la transformation d'un glycoprotéide circulant et qu'ensuite elle va fixer des substances diverses qui vont l'entraîner plus ou moins loin dans la phase albuminique tout en lui faisant perdre ses propriétés haptoenzymatiques.

f) *Fraction 2,45 à 2,8 M.* On floccule à ce niveau l'albumine véritable en n'entraînant avec elle que des traces d'impuretés polyholosidiques. Cette fraction est parfaitement

1) *Derrien*, loc. cit.

2) *Jayle, M.-F.*, et *Abdellatif*, Bl. Soc. Chim. biol. **28**, 80 (1946).

3) *Blix, G.*, J. Biol. Chem. **137**, 485 et 495 (1941).

4) *Jayle, M.-F.*, et *Gillard, P.*, Bl. Soc. Chim. biol. **28**, 63 (1946).

incolore et dans le sérum humain normal elle est de l'ordre de 30 gr. en moyenne. Il s'agit évidemment de l'albumine cristallisable et nous reviendrons plus loin sur la nature probable des traces de polyholosides entraînés.

g) *Fraction 2,8 à 3 M.* Entre 2,8 et 3 M, la quantité d'albumine qui précipite est peu importante, mais sa teneur en hydrates de carbone est plus élevée; comme dans le cas précédent, le polyholoside appartient à une substance incolore ce qui élimine l'éventualité de la présence de globulines α et β toujours fortement pigmentées.

h) *Fraction 3 M à DT.* Chez l'individu normal, l'azote qui précipite entre la molarité 3 M et la défécation trichloracétique est inférieur à 0,15 gr.; il peut dépasser considérablement ce taux dans certains plasmas pathologiques. Il s'agit ici d'une protéine à poids moléculaire vraisemblablement faible que nous considérons comme un polypeptide; c'est une observation constante que tous les sérums normaux d'homme ou de cheval que nous avons examinés possèdent dans cette zone une fraction riche en hydrates de carbone dont le taux oscille entre 15 et 30%; doit-on considérer qu'elle est constituée par le séromucoïde des auteurs classiques dont le taux en hydrates de carbone serait voisin de 20%? La réponse à cette question nous est fournie par les résultats obtenus chez les tuberculeux évolutifs où le sucre polyholosidique entre 3 M et DT. est en moyenne de 0,75 gr. alors qu'il n'est que de 0,20 chez les sujets normaux. Cette augmentation pathologique ne s'accompagne pas d'une élévation du taux des polypeptides, ce qui fait monter jusqu'à 80% le pourcentage glucidique de cette fraction. Inversement, dans d'autres cas, les concentrations polypeptidiques atteignent plusieurs grammes, sans entraîner un accroissement du sucre correspondant, et le pourcentage en hydrates de carbone devient très faible.

Les variations de ce mucoïde et du polypeptide sont donc parfaitement indépendantes l'une de l'autre, et nous en déduisons que le séromucoïde est de nature entièrement polyholosidique, ayant une concentration fixe chez l'individu normal et très augmentée chez les tuberculeux évolutifs.

i) *Sucre libre.* Le dosage colorimétrique du sucre libre du filtrat trichloracétique fournit des chiffres qui coïncident à 5% près à ceux que donne la technique de *Hagedorn*. Ce fait est une garantie de la précision de la méthode photométrique qui est parfaitement utilisable pour la détermination clinique de la glycémie; elle possède sur les techniques volumétriques l'avantage de la rapidité. En outre, on peut éliminer l'hypothèse d'un polyholoside non précipitable par l'acide trichloracétique, car, s'il existait, on devrait trouver avec la méthode colorimétrique, qui dose en même temps les oses et les polyholosides, des résultats plus forts que ceux fournis par le *Hagedorn*.

II.

Etablissement de la formule glycoprotéidique du sérum.

L'ensemble de nos résultats nous permet de considérer qu'il existe dans le sérum sanguin huit fractions principales:

1° *Macroglobuline.* Elle précipite à 0,75 M. Son intérêt réside dans les variations considérables qu'elle présente en pathologie. Son taux moyen est inférieur à 1 gr.^o/₁₀₀ chez le sujet normal.

2° *Mucoïde F.* Il représente le sucre polyholosidique qui précipite du sérum avec la macroglobuline de 0 à 0,75 M. Son taux moyen est de 0,4 gr.^o/₁₀₀.

3° *Globuline γ .* Pour calculer cette fraction, on part du principe qu'elle est exempte d'hydrates de carbone et qu'elle précipite entre 0,75 et 2,2 M. Pour en déduire les globulines α et β , on fixe conventionnellement à 10% leur taux en glucides et on multiplie par 10 la quantité de sucre protéidique qui précipite entre 1,5 et 2,2 M. Son taux, assez constant, est en moyenne de 13 gr.^o/₁₀₀.

4° *Glycoprotéïdes.* On applique la même définition que précédemment et on multiplie par 10 le sucre protéidique qui précipite entre 1,5 et 2,45 M et dont le taux moyen normal est de 1 gr.^o/₁₀₀.

5° *Albumine véritable*. On retranche des protéines totales précipitées entre 2,2 et 3 M les glycoprotéides entraînés entre 2,2 et 2,45 M. Le taux moyen de l'albumine est de 38 gr.^o/₁₀₀ et est soumis à des variations relativement faibles chez les sujets examinés. Ce taux assez constant est une preuve de la supériorité de cette dernière détermination sur la méthode classique qui fournit des résultats très variables d'un sujet à l'autre.

Cette fraction peut être divisée en albumines A₁ et A₂ qui précipitent respectivement entre 2,2—2,8 et 2,8—3 M. La fraction A₂ augmente dans certains cas pathologiques.

6° *Séromucoïde*. Il est représenté par le sucre polyholosidique qui précipite entre 2,45 M et DT. Il paraît aussi fixe que la glycémie et son taux moyen chez le sujet normal est de 0,56 gr.^o/₁₀₀, ses variations n'excédant pas 10%. Chez les tuberculeux évolutifs, son taux augmente considérablement et peut atteindre 1,5 gr.^o/₁₀₀.

7° *Polypeptides*. On dénomme ainsi l'azote protéique qui précipite entre 3 M et DT. Son taux moyen est de 0,91 gr.^o/₁₀₀, mais il présente des variations en pathologie.

8° On dose d'autre part l'haptoglobine par la technique enzymatique déjà décrite¹⁾.

III.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Le sucre protéidique se répartit en trois fractions principales dans le sérum sanguin. La première est représentée par un polyholoside qui précipite à 0,75 M du mélange de phosphates et nous émettons l'hypothèse selon laquelle ce mucoïde F se détacherait de la molécule de fibrinogène au moment de la coagulation.

La seconde fraction fait partie des globulines β et précipite entre 1,7 et 2,45 M. C'est aux dépens de cette fraction que se forme l'haptoglobine et celle-ci, en se liant à des protéines ou à des substances toxiques, pénètre dans la phase albuminique. Cette migration des globulines riches en hydrates de carbone est une des raisons de l'augmentation du rapport sucre albuminique/sucre globulinique en pathologie.

La troisième fraction glucidique est composée par un polyholoside, le séromucoïde, dont le taux chez le sujet normal est remarquablement fixe. Il augmente considérablement au cours des tuberculoses évolutives.

Deux fractions protéiques semblent avoir un grand intérêt clinique: l'une, la macroglobuline, précipite du sérum à 0,75 M, l'autre, que nous dénommons polypeptide, entre 3 M et le filtrat trichloracétique. A l'état de traces chez le sujet normal, ces protéines extrêmes augmentent en concentration dans certains états pathologiques.

Il existe un diagramme normal de la précipitation combinée de l'azote et du sucre polyholosidique. On le traduit par une formule glycoprotéidique qui groupe 8 substances que nous dénommons: macroglobuline, globuline γ , glycoprotéide $\alpha\beta$, albumine, mucoïde F, séromucoïde, polypeptide et haptoglobine.

Laboratoire de Chimie biologique
de la Faculté de Médecine à Paris.

¹⁾ *Jayle, M.-F., et Gillard, P.*, Bl. Soc. Chim. biol. **28**, 63 (1946).