

CHROM. 5457

Chromatographies sur hydroxyapatite de sérum et de plasma humain normal; caractérisation de quelques-uns de leurs constituants

Les constituants du sérum et du plasma humain sont isolés par différentes techniques de précipitation ou de chromatographie. Dans ce dernier domaine, ce sont les techniques de séparation sur échangeurs d'ions qui ont recueilli le plus grand succès. Les techniques de séparation sur hydroxyapatite (HTP) mises au point par TISÉLIUS *et al.* en 1956¹, ont aussi été appliquées à la séparation des constituants du sérum humain², mais, apparemment avec des difficultés qui les ont rapidement faites abandonner. Ces difficultés étaient essentiellement dues à la technologie laborieuse de préparation de l'HTP et au fait que cette technique chromatographique est restée empirique jusqu'aux travaux de BERNARDI ET KAWASAKI³.

Dans le travail présent, nous avons repris l'expérimentation de HJERTÉN² et avons voulu comparer la séparation et l'élution des constituants du sérum humain normal par chromatographie sur HTP en fonction de la température. En effet, on sait que, dans cette technique chromatographique, la température joue un rôle important dans l'adsorption des protéines et donc dans leur séparation à l'élution⁴. Par ailleurs, nous avons voulu comparer les différences d'adsorption et d'élution sur HTP, du sérum humain après coagulation du sang dans des conditions normales et du plasma humain recalciifié, car on sait que le chlorure de calcium modifie les propriétés d'adsorption de l'HTP et altère l'affinité du support pour les protéines⁵.

Les résultats obtenus montrent (a) que l'abaissement de la température de chromatographie favorise la séparation des constituants du sérum comme du plasma, en augmentant les propriétés d'adsorption sur HTP, et (b) une gamme d'élution des IgG beaucoup plus étendue pour le sérum que pour le plasma quelle que soit la température de chromatographie.

Matériaux et méthodes

L'expérimentation a été conçue en réalisant des chromatographies simultanées de sérum et de plasma humain non-dialysés, à 4° et à température ambiante contrôlée (21°).

Sérum et plasma mis en chromatographie. Tous deux proviennent de sang humain normal groupe AB. (a) Le sérum est un sérum vrai provenant d'un sang récolté sans anti-coagulant. (b) Le plasma provient d'un sang récolté sur anti-coagulant (Alsever), centrifugé et défibriné par CaCl₂ 0.012 M.

Chromatographies. Les colonnes d'HTP sont préparées à partir du produit commercial Bio-Gel HTP (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., U.S.A.). Elles sont de 15 à 16 × 2 cm, équilibrées en tampon phosphate de K⁺, 0.02 M, pH 6.8. Les tampons sont préparés à partir de solutions des phosphates mono- et di-potasique aux concentrations molaires désirées. Des volumes de 2 ml de plasma et de sérum sont appliqués sur les colonnes.

Les chromatographies sont effectuées en paliers avec une vitesse d'élution de 30 ml/h. Un collecteur de fractions permet de recueillir des fractions de 5 ml.

Concentrations. Les pics d'élution des chromatographies sont concentrés sur Diaflo, avec membranes PM 10 (Amicon Corp. Lexington, Mass., U.S.A.).

Adsorption ultra-violette. Les mesures de densités optiques sont faites à $280\text{ m}\mu$, avec un spectrophotomètre Beckman DB-G.

Analyses immuno-électrophorétiques (AIE). Les analyses sont réalisées suivant la technique de GRABAR⁶ sur des plaques de $75 \times 25\text{ mm}$ en tampon véronal-véronal sodé $\mu = 0.1$, $\text{pH} = 6.8$, avec l'appareillage Gelman (Gelman Instruments Co., Ann Arbor, Mich., U.S.A.). La gélose utilisée est de l'agar noble (Difco) à la concentration de 1.25% (p/v). La tension appliquée aux plaques est de 7 V/cm pendant 45 min. L'immunsérum est du sérum de cheval anti-humain complet de Hyland (Hyland Div., Travenol Laboratories Inc., Costa Mesa, Calif., U.S.A.).

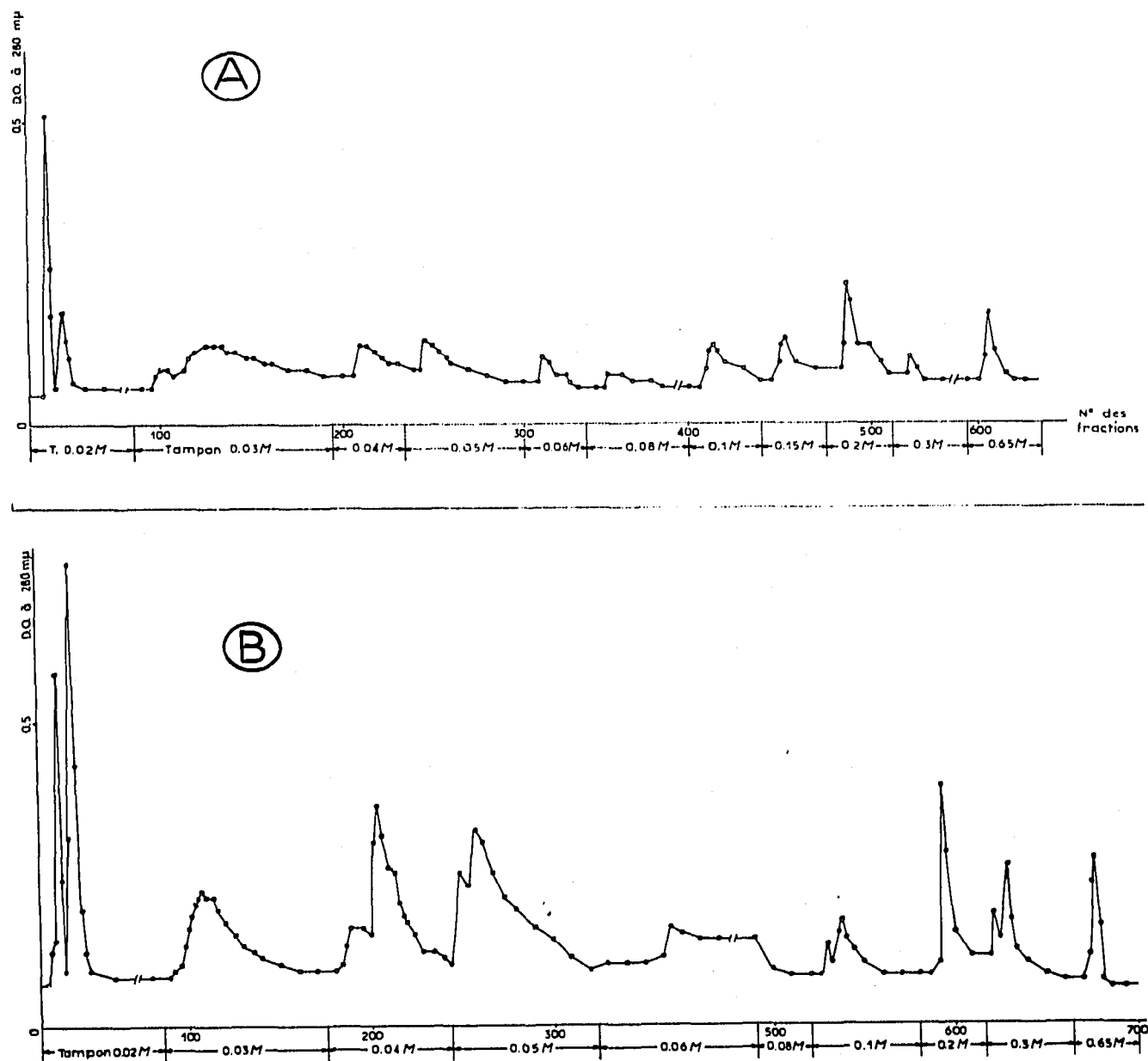


Fig. 1. Chromatographie de plasma humain. Colonnes de $15 \times 2\text{ cm.}$ Vitesse d'éluion: 30 ml/h. Volume des fractions: 5 ml. Volumes mis en chromatographie: 2 ml. A, chromatographie à 4° ; B, chromatographie à 21° .

Analyses par immuno-diffusion. Ces analyses sont réalisées suivant une micro-méthode dérivée d'OUCHTERLONY⁷ avec l'appareil Gelman. Les puits, d'un diamètre de 2 mm et d'une profondeur de 1 mm, sont distants de 8 mm. La diffusion est réalisée pendant 20 h à température ambiante.

Les anti-sérums mono-spécifiques anti-albumine, anti-orosomucoïde et anti-transferrine (Mann Research Laboratories, B.D. Div., New York, U.S.A.), ainsi que les anti-sérums anti-IgG et anti-IgM (Hyland), ont été utilisés.

Caractérisation des protéines. Ces caractérisations sont faites à l'aide des colorations spécifiques: Noir amidé pour les protéines, Soudan noir pour les lipo-protéines et réactif de Schiff pour les gluco-protéines⁸.

Dosage des protéines. Il est effectué par une micro-méthode au biuret selon la technique d'ITZHAKI ET GILL⁹.

Résultats

Chromatographies de plasma humain. Les chromatogrammes à 4° et 21° ont un profil très différent (Fig. 1A et B). En effet, les pics d'éluion aux différents paliers et spécialement de 0.02 à 0.05 M, sont beaucoup plus élevés à température ambiante qu'à basse température. Les AIE et les immuno-diffusions montrent (Tableau I) que le rang d'éluion des différentes substances constituantes du plasma est plus étendu à 4° qu'à 21°; adsorption plus forte, donc éluion plus progressive, et apparemment meilleure séparation.

À 4°, les albumines sont éluées de 0.02 à 0.08 M, tandis qu'à 21° l'éluion est

TABLEAU I

ÉLUION DES CONSTITUANTS SÉRIQUES ET PLASMATIQUES AU COURS DES DIFFÉRENTES CHROMATOGRAPHIES SUR HTP

Pré-Alb. = pré-albumines; Alb. = albumines; Transf. = transferrines.

Les caractérisations ont été faites par les techniques d'AIE et d'immuno-diffusion, avec des anti-sérums entiers ou spécifiques (voir *Matériaux et méthodes*).

Molarité d'éluion	Chromatographies de plasma humain		Chromatographies de sérum humain	
	4°	21°	4°	21°
0.02	1 ^o pic 0 ^o pic	a1	a1	a1
	Alb., a1, a2, β2, Transf.	Alb., a1, a2, β1, β2	Alb., a1, a2, β1, β2	Alb., a1, a2, β1, β2, Transf.
0.03	Alb., a1, β1, Transf.	Alb., β1, IgG, Transf.	Alb., a1, a2, β1, IgG, Transf.	Alb., a1, β1, IgG, Transf.
0.04	Pré-Alb., Alb., a1, a2, β1, Transf.	Pré-Alb., Alb., a1, a2, β1, IgG	Pré-Alb., Alb., a1, a2, β1, IgG, Transf.	Alb., a1, IgG
0.05	Pré-Alb., Alb., a1, a2, β1	a1	Pré-Alb., Alb., a1, a2, IgG	Alb., a1, a2, β1, IgG
0.06	Pré-Alb., Alb., a2, β1	—	Pré-Alb., Alb., a1, a2, IgG	a1
0.08	Alb., a2, β1, IgG	—	Pré-Alb., Alb., a1, a2, IgG	a1, IgG
0.1	a2, β1, IgG	—	Pré-Alb., Alb., a2, IgG	a1
0.15	a1, a2, IgG	—	β1, IgG	IgG
0.2	a2, IgM, β1	IgM	β1, IgM	IgM
0.3	a2	—	IgM	—
0.65	a1, β1	—	a1, a2	—

plus rapide, se situant entre 0.02 et 0.04 *M*. Les transferrines ne voient pas leur élution modifiée par la température: de 0.02 à 0.04 *M* pour 4° et à 0.03 *M* pour la température ambiante. Il en va de même pour les IgM qui sont éluées à 0.2 *M*. Par contre, l'élution des IgG est considérablement modifiée par la température de chromatographie: à 4° les IgG sont éluées de 0.08 à 0.15 *M*, alors qu'elles sont éluées en un seul palier à 0.04 *M*. Quelle que soit la température, une α -protéine est éluée seule, dans le palier de départ 0.02 *M*.

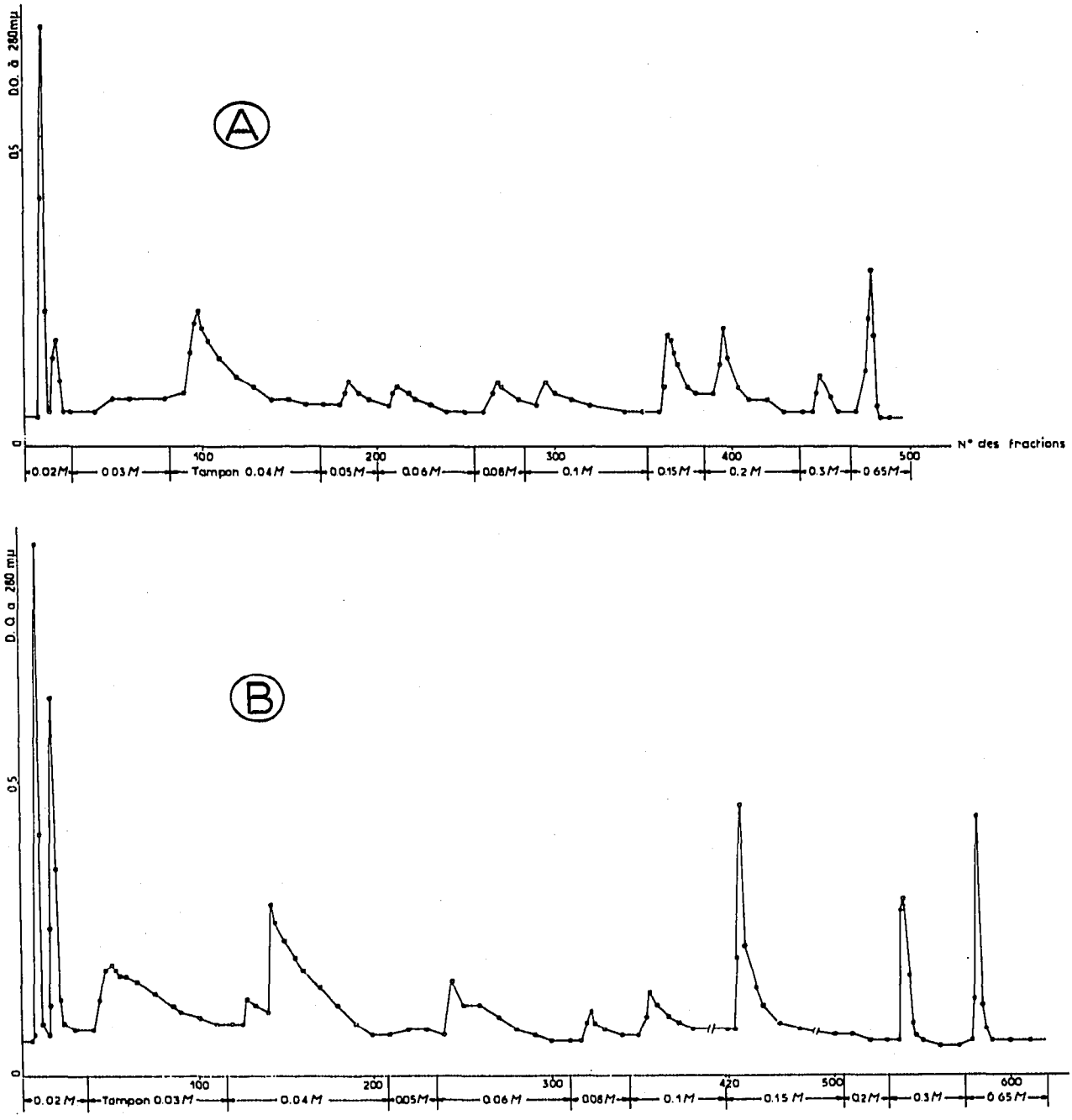


Fig. 2. Chromatographie de sérum humain. Caractéristiques de chromatographie identiques à la Fig. 1. A, chromatographie à 4°; B, chromatographie à 21°.

La chromatographie de plasma humain normal à basse température conduit donc à la séparation préalable des albumines et des IgG, ainsi que des IgM à 0.2 *M* et de cette α -protéine à 0.02 *M*.

Chromatographie de sérum humain. Dans leur ensemble, les chromatogrammes obtenus viennent confirmer les résultats de chromatographies de plasma humain. En effet, le profil du chromatogramme à 21° est plus élevé qu'à 4° (Fig. 2A et B). D'autre part les AIE et les immuno-diffusions montrent que les albumines, les transferrines et les IgM du sérum ont le même comportement chromatographique en fonction de la température que leurs correspondantes plasmatiques. Il n'en va pas de même pour les IgG: en effet, ces dernières sont éluées entre 0.03 et 0.15 *M* quelle que soit la température. C'est là une élution très différente de celle que nous avons observée pour les IgG plasmatiques qui sont éluées entre 0.08 et 0.15 *M* à 4° et surtout à 0.04 *M* à température ambiante (Tableau I). On n'observe donc pas une aussi bonne séparation des IgG et albumines sériques à 4° que celle des IgG et albumines plasmatiques à la même température.

Enfin, ces chromatographies de sérum humain montrent aussi la séparation en début de chromatographie d'une α -protéine qui s'est révélée être la même en immuno-diffusion que celle isolée du plasma. Les techniques de colorations spécifiques⁸ nous ont permis de voir qu'il s'agissait d'une protéine ne possédant de radical ni glucidique ni lipidique.

Dans le cas du sérum comme du plasma, nous n'avons pu situer le rang d'élution de l'orosomucoïde, car les immuno-diffusions et les AIE spécifiques sont restées négatives.

Discussion

Comparaison avec le travail de HJERTÉN. Les résultats obtenus dans notre expérimentation infirment partiellement les résultats de HJERTÉN en 1959². En effet, aucun des profils chromatographiques du plasma ou du sérum à 4° ne peut être comparé à celui obtenu par cet auteur. De même, le rang d'élution des albumines humaines que cet auteur situe entre 0.07 et 0.65 *M*, n'a pu être confirmé dans notre travail où les albumines sont éluées entre 0.02 et 0.1 *M*. Cette discordance dans les résultats pourrait en partie provenir du fait que HJERTÉN a opéré ses paliers à volume égal d'élution sans tenir compte du déplacement éventuel de protéines par d'autres protéines plus fortement adsorbées sur HTP³. Une différence de nature des HTP utilisées par HJERTÉN et nous-mêmes pourrait aussi être invoquée: en effet, HJERTÉN préparait ce support au laboratoire, tandis que nous utilisons un produit commercial. Toutefois, lors d'un précédent travail concernant la purification de l' α -hémolysine staphylococcique⁴, nous n'avons observé aucune différence de comportement des protéines sur l'HTP préparée au laboratoire selon la méthode de TISELIUS *et al.*¹ ou sur le produit commercial Bio-Rad. Il n'en reste pas moins que l'intégrité structurale des cristaux d'HTP doit être respectée pour obtenir une bonne reproductibilité chromatographique.

Cependant, pour ce qui concerne l'élution des fractions γ -globuliniques, nos résultats sont en concordance, puisque nous retrouvons les IgG éluées entre 0.03 et 0.15 *M*.

Comparaison des chromatographies sérum et plasma en fonction de la température. Le Tableau I montre sans ambiguïté que la résolution des chromatogrammes est

meilleure à 4° qu'à 21° et ceci aussi bien pour le plasma que pour le sérum. En effet, pour le plasma à température ambiante, tout est élué dès 0.05 M sauf les IgM, alors qu'à basse température, l'éluion des constituants plasmatiques se fait progressivement. Ces résultats sont confirmés par les dosages et les rendements protéiques effectués sur les pics de chromatographie. Il en va sensiblement de même pour les chromatographies de sérum à 4° et 21°: l'éluion se fait plus rapidement à haute qu'à basse température.

Cependant, si l'on compare les résultats de chromatographie deux à deux: c'est-à-dire sérum et plasma à température ambiante et sérum et plasma à 4°, on constate qu'aux deux températures la gamme d'éluion des constituants du sérum est plus étendue que celle des constituants du plasma. Ainsi, dans la chromatographie du plasma à 4°: les albumines sont éluées de 0.02 à 0.08 M, les pré-albumines de 0.04 à 0.06 M, les IgG de 0.08 à 0.15 M, les IgM à 0.2 M, alors que dans la chromatographie du sérum à la même température, les albumines sont éluées de 0.02 à 0.1 M, les pré-albumines de 0.04 à 0.1 M, les IgG de 0.03 à 0.15 M, les IgM à 0.2 et 0.3 M. On constate le même phénomène dans les chromatographies de plasma et de sérum à 21°. Cette différence de comportement du plasma recalcifié et du sérum vrai vis-à-vis de l'HTP peut être liée à deux causes produisant le même effet: l'excès de calcium présent dans le plasma modifie la charge électrique des protéines plasmatiques en se fixant sur des molécules chargées négativement; et le citrate présent en excès dans le plasma entre en compétition avec les ions PO_4^{2-} des tampons au niveau de l'HTP diminuant ainsi l'adsorption de protéines faiblement chargées. Ces deux phénomènes conjugués aboutissent à l'éluion plus rapide des constituants plasmatiques que des constituants sériques, parce que plus faiblement adsorbés à la surface des cristaux d'HTP.

Conclusion

Ainsi que HJERTÉN l'avait déjà montré, la chromatographie du sérum sur HTP peut représenter une étape importante dans la séparation de ses divers constituants, soit en travaillant à partir de sérum entier, soit en appliquant cette méthode à la séparation des divers composants contenus dans les fractions de Cohn.

Nous remercions Mesdemoiselles N. BROCARD et C. DEVILLE pour leur excellente collaboration technique.

Institut Mérieux,
69-Marcy l'Étoile (France)

G. VIDAL
J. P. RUEL

- 1 A. TISELIUS, S. HJERTÉN ET Ö. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132.
- 2 S. HJERTÉN, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 216.
- 3 G. BERNARDI ET T. KAWASAKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 160 (1968) 301.
- 4 G. VIDAL, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 279.
- 5 E. A. PETERSON ET H. A. SOBER, en F. W. PUTNAM (Éditeur), *The Plasma Proteins*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1960, p. 105.
- 6 P. GRABAR, en P. GRABAR ET P. BURTIN (Éditeurs), *Analyse Immuno-électrophorétique*, Masson, Paris, 1960, p. 5.
- 7 O. OUCHTERLONY, *Ark. Kemi. Mineral. Geol.*, 26 B (1948) 1.
- 8 J. URIEL, en P. GRABAR ET P. BURTIN (Éditeurs), *Analyse Immuno-électrophorétique*, Masson, Paris, 1960, p. 33.
- 9 R. F. ITZHAKI ET D. M. GILL, *Anal. Biochem.*, 9 (1964) 401.

Reçu le 2 avril, 1971; manuscrit modifié reçu le 14 mai, 1971