

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES γ -GLOBULINES URINAIRES

PIERRE CORNILLOT, ROLAND BOURRILLON, JEAN MICHON ET RENÉ GOT

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Paris (France)

(Reçu le 30 juillet, 1962)

SUMMARY

Isolation and characterization of urinary γ -globulins

The γ -globulin fraction of normal urine, obtained by precipitation with 2 M ammonium sulfate, followed by DEAE-cellulose chromatography, contains several components with different molecular weight. These components are separated by chromatography on Sephadex G-100 as ultracentrifugationally homogeneous substances. The urinary 7-S γ -globulin shows the same physico-chemical and immunochemical characteristics as the plasmatic γ -globulin. The 3.5-S γ -globulin differs from the 7-S γ -globulin by the molecular weight and its immunochemical behaviour. Last, the 2.2-S γ -globulin is slightly antigenic and contains more glucides than the two other fractions. No γ -globulin having a sedimentation coefficient lower than 2 S can be found in urine.

INTRODUCTION

Soupçonnée par les premières études électrophorétiques de RIGAS ET HELLER¹, la présence de γ -globulines dans l'urine humaine normale a été définitivement démontrée par immunoélectrophorèse^{2,3}. Par électrophorèse de zone des protéines urinaires totales, WEBB, SEHON ET ROSE⁴, FRANKLIN⁵ ont obtenu une fraction protéique de mobilité électrophorétique et d'antigénicité comparables à celles des γ -globulines plasmatiques. Toutefois, le poids moléculaire est nettement plus faible, de l'ordre de 10000-30 000. Selon ces auteurs, il s'agirait de produits de dégradation des γ -globulines sériques.

Récemment, BERGGÅRD⁶ a pu trouver, à la fois dans le plasma et dans l'urine, une protéine présentant une identité partielle avec les γ -globulines 7 S; le poids moléculaire n'a pas été déterminé mais il serait faible.

Si la présence de γ -globulines dans l'urine est certaine, la nature et l'origine de ces protéines demeurent hypothétiques. Ce travail rapporte l'isolement et la caractérisation de γ -globulines urinaires de poids moléculaires différents.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation de la fraction γ -globuline

Cette préparation comporte 3 étapes:

Préparation des protéines urinaires précipitables dans l'éthanol à 50 %: L'urine normale (100 l d'un mélange d'urines mâles) est lyophilisée après dialyse pendant

48 h sous eau courante. Le produit obtenu est extrait trois fois par l'eau sous agitation mécanique; chaque extraction est suivie d'une centrifugation; le pH des solutions surnageantes est alcalin (pH 8-8.5). Deux nouvelles extractions sont effectuées à pH 7. Les 5 extraits colorés mais limpides, sont réunis.

La solution obtenue, de pH 7.8, est dialysée pendant deux jours à +4°, contre dix fois son volume d'eau distillée. Après ce temps, elle est additionnée d'éthanol jusqu'à une concentration finale de 50 %. L'opération est effectuée à -5°. Après 1 h, le précipité formé est centrifugé à basse température, puis il est lavé par l'éthanol absolu, l'acétone et l'éther sec; il est ensuite séché sous vide.

Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium: Le produit obtenu dans l'étape précédente, solubilisé dans NaCl à 1% et pH 7, est additionné d'une solution de sulfate d'ammonium 4 M pour obtenir une concentration finale de 2 M. Le précipité formé est recueilli après 24 h, lavé par une solution de sulfate d'ammonium 2 M, dialysé contre eau distillée et lyophilisée.

Chromatographie sur DEAE-cellulose: La DEAE-cellulose (Serva, 0.52 méquiv/g) est lavée par la soude, par l'alcool et par l'eau. Elle est ensuite équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 0.01 M (pH 7.5). L'échangeur est dégazé puis versé dans une colonne de 30 x 3 cm et ensuite tassé par légère dépression. La fraction à étudier, obtenue dans l'étape précédente (1.3 g correspondant à 100 l d'urines) est solubilisée dans 50 ml de tampon phosphate de sodium 0.01 M (pH 7.5) et introduite dans la colonne. L'élution est effectuée à +4° par ce même tampon.

Des fractions de 10 ml sont recueillies, sur lesquelles on détermine le taux en protéines⁸; on réunit le contenu des tubes correspondant à un pic. Les solutions sont dialysées contre de l'eau distillée et lyophilisées.

Fractionnement sur Sephadex

Deux types de Sephadex (Pharmacia (Suède)) sont utilisés: G-75 (lot No. To 8869 M, medium) et G-100 (lot No. To 33, 140-400 mesh)*. Le déplacement des protéines est effectué par un tampon: phosphate de sodium 0.005 M-NaCl 0.1 M (pH 7.4) ou véronal sodique $\mu = 0.1$ (pH 8). Dans tous les cas, la dimension des colonnes est 1.5 x 35 cm. On recueille des fractions de 2.5 ml sur lesquelles on détermine les protéines⁸.

Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation analytique est effectuée à la Station Centrale du CNRS, dans la centrifugeuse Spinco (modèle E) à 59870 tours/min, à 20°, dans le tampon phosphate-NaCl 0.1 M (pH 7.1). Trois concentrations de protéine (0.5, 0.7 et 1%) sont utilisées pour chaque échantillon.

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet est réalisé avec le spectrophotomètre Jobin et Yvon, dans l'eau et dans une solution de soude 0.1 N.

Détermination des glucides réducteurs

La détermination des glucides réducteurs totaux est effectuée par la technique de SOMOGYI⁹, après hydrolyse par 1 N HCl pendant 3 h à 100°.

* Les auteurs remercient vivement le Dr. GELOTTE qui leur a aimablement fourni un échantillon de Sephadex G 100.

Immunochimie

Immunoélectrophorèse selon la microtechnique de SCHEIDECKER¹⁰. L'agar (Agar Noble Difco) est dissous dans le tampon véronal sodique-HCl, $\mu = 0.1$ (pH 8.6). Le gradient de potentiel est de 6 V/cm et le temps de migration de 60 min.

Double diffusion selon une microtechnique, d'après OUCHTERLONY¹¹.

Antisérum: les antisérum suivants sont utilisés. Sérum équin anti-sérum humain total No. 13486 et 13461 de l'Institut Pasteur; sérum de lapin anti γ -globuline No. 225 A délivré par Behringwerke A.G. Marburg/L.

RÉSULTATS

Localisation des fractions γ -globulines par chromatographie sur DEAE-cellulose

La localisation des γ -globulines, au cours de la chromatographie sur DEAE-cellulose, est suivie par immunoélectrophorèse avec les immunosérum anti-sérum humain total et anti γ -globuline. Toutes les protéines à activité antigénique γ se situent dans l'effluent 0.01 M; celui-ci présente 3 pics: le premier, le plus important, donne en immunoélectrophorèse une longue ligne de précipitation, très nette, semblable à celle de la γ -globuline sérique, et une seconde ligne de plus faible intensité et de plus grande diffusion. Les deux autres pics, de migration légèrement plus rapide que le pic I en électrophorèse sur papier, donnent en immunoélectrophorèse, des lignes plus courtes et de plus faible intensité.

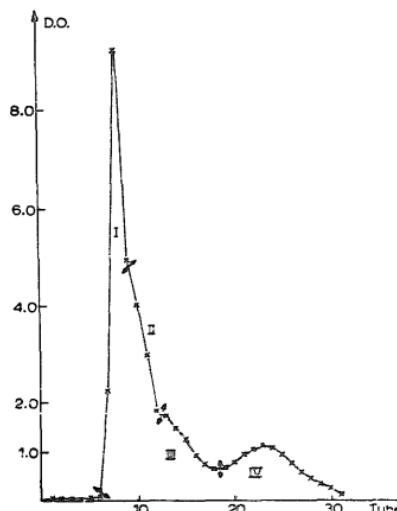


Fig. 1. Chromatographie sur Sephadex G-75 des γ -globulines urinaires (fraction des protéines urinaires totales précipitées par le sulfate d'ammonium 2 M). Elution par un tampon phosphate-NaCl 0.1 M (pH 7.4) à 20°. D.O., densités optiques à 500 m μ (Lowry).

Aucune de ces trois fractions n'est homogène en ultracentrifugation où l'on peut déceler deux frontières distinctes à 6.5 S et 3.1-3.3 S. Pour cette dernière raison, le fractionnement sur Sephadex sera réalisé, non sur chaque fraction séparée, mais sur l'effluent total.

Fractionnement sur Sephadex

Sephadex G-75: 150 mg de l'effluent DEAE-cellulose, dissous dans 5 ml de tampon phosphate-NaCl sont déposés sur la colonne de Sephadex G-75. L'élution est effectuée avec ce tampon. La Fig. 1 rapporte le diagramme obtenu. Celui-ci est découpé en 4 fractions, qui sont chacune étudiées en ultracentrifugation à la concentration de 0.7% en protéine totale; la première présente une frontière unique étroite et symétrique, $s_{20,w} = 6.5$ S (Fig. 2A); la deuxième est hétérogène avec deux constituants, $s_{20,w} = 6.4$ S et 3.4 S (Fig. 2B); la troisième présente une seule frontière,

symétrique mais élargie, témoignant d'une diffusion importante et dont la constante de sédimentation $s_{20,w} = 2.05$ S (Fig. 2C).

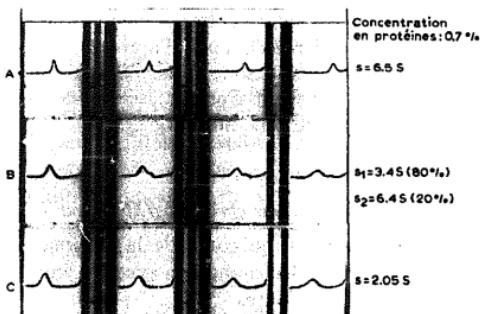


Fig. 2. Diagrammes d'ultracentrifugation des γ -globulines urinaires séparées sur Sephadex G-75.

Sephadex G-100: La deuxième fraction, qui, au cours du passage sur Sephadex G-75, s'est révélée hétérogène en ultracentrifugation, est soumise à la chromatographie sur Sephadex G-100 dans le tampon véronal, $\mu = 0.1$ (pH 8). Le diagramme obtenu est représenté sur la Figure 3: trois pics sont bien individualisés.

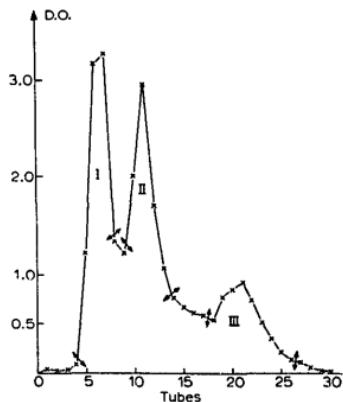


Fig. 3. Chromatographie sur Sephadex G-100 de la fraction II obtenue au cours de la chromatographie sur Sephadex G-75. Elution par un tampon véronal (pH 8.0), $\mu : 0.1$. D.O., densités optiques à $500 \text{ m}\mu$ (Lowry).

Par ultracentrifugation des trois fractions à la concentration de 0.7 %, les constantes de sédimentation sont: 6.5 S pour I, 3.15 S pour II (Fig. 4); le pic III est constitué d'un produit dépourvu d'activité antigénique γ .

Ainsi, le fractionnement sur Sephadex G-75 et G-100 a permis de séparer trois fractions à activité antigénique γ , de poids moléculaire différent.

Caractérisation des différentes fractions γ -globulines

Ultracentrifugation: La constante de sédimentation à dilution infinie des trois fractions homogènes en ultracentrifugation a été déterminée: 1, 6.9 S; 2, 3.5 S; 3, 2.2 S.

Le composé 1 sera par la suite appelé γ 7 S.

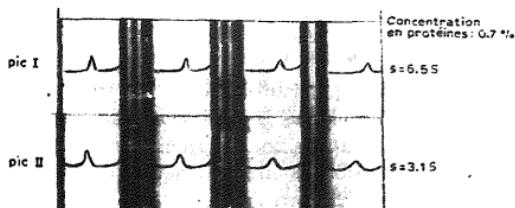


Fig. 4. Diagrammes d'ultracentrifugation des fractions γ -globulines séparées sur Sephadex G-100.

Spectre d'absorption: Les spectres d'absorption des 3 fractions γ urinaires sont représentés sur la Fig. 5. Ils ne diffèrent pas sensiblement, surtout les deux premiers qui sont à peu près identiques. Le déplacement du spectre en milieu alcalin vers les longueurs d'onde plus élevées témoigne de la présence de tyrosine.

La longueur d'onde du maximum d'absorption est de $278 \text{ m}\mu$ avec les coefficients d'absorption 12.3, 11.6 et 10.2 respectivement pour les γ 7 S, 3.5 S et 2.2 S.

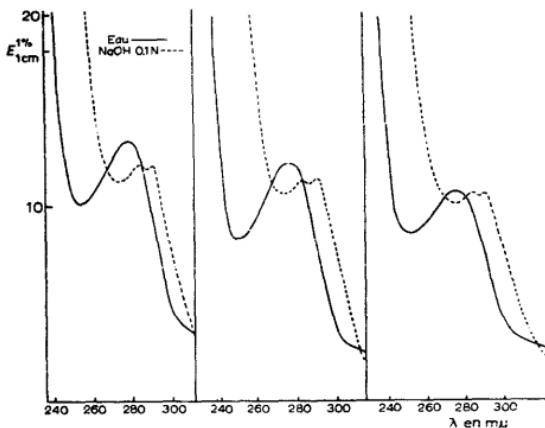


Fig. 5. Spectre d'absorption dans l'ultraviolet, des trois fractions γ -globulines urinaires. Solvants: eau et NaOH 0.1 N.

Des données du spectre d'absorption, on peut calculer les teneurs en tyrosine et tryptophane, d'après la méthode de GOODWIN ET MORTON¹².

On trouve: 2.7 % de tryptophane et 5.6 % de tyrosine pour les γ 7 S, 2.5 % de tryptophane et 5.6 % de tyrosine pour les γ 3.5 S, 2.4 % de tryptophane et 5.3 % de tyrosine pour les γ 2.2 S.

Détermination des glucides réducteurs: Les taux de glucides réducteurs totaux (hexoses + osamines + 6-désoxyhexoses) sont faibles dans le cas des γ S (2.3 %) et 3.5 S (2.1 %), et nettement plus élevés pour les γ 2.2 S (6.15 %).

Immunochimie: La fraction 1 (γ S) donne, avec le sérum antisérum total et le sérum anti γ , une seule ligne de précipitation en immunoélectrophorèse, comparable à celle fournie par la γ -globuline plasmatique témoin. Ces deux fractions, urinaire et sérique, montrent, par la technique de double diffusion, une réaction d'identité totale.

La fraction 2 (γ 3.5 S) fait apparaître en immunoélectrophorèse, une bande très fine, moins intense et plus diffusible que la γ S. En immunodiffusion, 2 bandes sont visibles, l'une de faible intensité, donne une réaction d'identité totale avec la γ 7 S, et l'autre, plus nette et plus diffusible, donne une réaction d'identité partielle. Parfois, une troisième bande apparaît contre cette dernière.

La fraction 3 (γ 2.2 S) ne montre aucune ligne de précipitation avec le sérum antisérum total, mais donne une ligne avec le sérum anti γ en immunoélectrophorèse et immunodiffusion. La γ 2.2 S, faiblement antigénique, présente une réaction d'identité partielle avec la γ 7 S.

Le Tableau I résume les caractéristiques de ces γ -globulines urinaires. Il apparaît que la γ 7 S urinaire est semblable à la γ -globuline plasmatique, tandis que la 3.5 S diffère de la γ S par le poids moléculaire et les caractéristiques immunochimiques.

TABLEAU I
CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRACTIONS γ -GLOBULINES URINAIRES

	γ -plasmatique	γ -urinaire (γ S)	γ -urinaire (3.5 S)	γ -urinaire (2.2 S)
$s_{20,w}$	6.6-7 S	6.9 S	3.5 S	2.2 S
$E_{1cm}^{1\%}$	--	12.3	11.6	10.2
Tyrosine (%)	6.75	5.6	5.6	5.3
Tryptophane (%)	2.6-2.9	2.7	2.5	2.4
Glucides réducteurs totaux (%)	2.3-3.1	2.3	2.1	6.15
Immunologie: Antigénicité	+++	+++	++	+
Identité vis à vis des γ S plasmatiques		Complète	Partielle	Partielle

DISCUSSION

WEBB, SEHON ET ROSE⁴ séparent les protéines urinaires par électrophorèse de zone et admettent que celles-ci, sauf l'albumine, ont un poids moléculaire inférieur aux protéines correspondantes du plasma. Ainsi, la constante de sédimentation des γ -globulines urinaires serait de 1.12 S, soit un poids moléculaire de 10 000. FRANKLIN⁵, par le même procédé, rapporte la présence de façon inconstante de γ -globulines 7 S dans l'urine, mais la plus grande partie de la fraction γ serait constituée d'un produit de constante de sédimentation 1.5-1.6 S, avec une teneur élevée en glucides. En outre, ces deux groupes de chercheurs admettent une excrétion journalière de 16 mg, quantité supérieure à celle de l'albumine urinaire.

Nos résultats diffèrent sensiblement de ceux des précédents auteurs: la quantité de γ -globulines excrétées dans l'urine est plus faible (2 mg/24 h) ainsi que le taux des glucides. En outre, nous n'avons jamais retrouvé de fractions γ -globulines dont la constante de sédimentation soit inférieure à 2.

Ces divergences peuvent s'expliquer par le fait que WEBB *et al.*⁴ et FRANKLIN⁵ effectuent leur fractionnement électrophorétique sur les protéines totales de l'urine dont une partie importante est constituée de glycopeptides riches en glucides et de faible poids moléculaire ($s_{20,w} = 1\text{ S}$); une partie de ceux-ci migre comme les γ -globulines. Au contraire, le fractionnement partiel que nous opérons, laisse ces glycopeptides en solution dans l'éthanol à 50 % ou dans le sulfate d'ammonium 2 M.

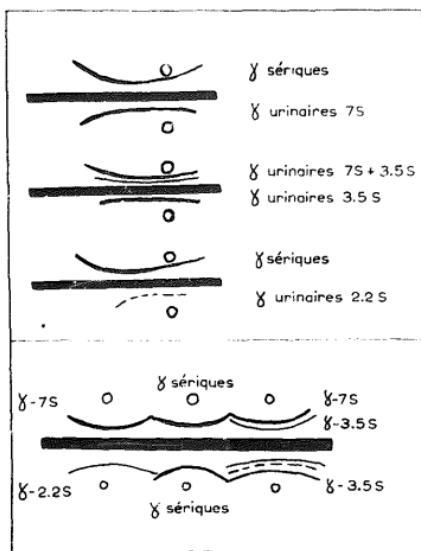


Fig. 6. Analyse immunologique des γ -globulines urinaires séparées sur Sephadex. A, immunoelectrophorèse; B, double diffusion dans l'agar. Ces analyses ont été effectuées contre un sérum de lapin anti- γ -globulines sériques.

La pluralité des γ -globulines urinaires est mise en évidence par leur séparation sur Sephadex en fractions homogènes possédant toutes une activité antigénique γ -globuline, mais différent par le poids moléculaire. La présence de γ 7 S dans l'urine est démontrée de façon certaine par leur isolement. La constante de sédimentation, la migration électrophorétique, le spectre d'absorption, le taux des glucides et les caractères immunochimiques permettent de les identifier aux γ -globulines plasmatiques. Leur pourcentage, par rapport à l'ensemble des γ -globulines urinaires est de 25-30 %.

Des γ -globulines de faible poids moléculaire, la plus importante représente une constante de sédimentation de 3.5 S. Elle est totalement séparée de la γ 7 S sur Sephadex G-100; elle migre un peu plus rapidement que cette dernière en électrophorèse sur papier et présente avec elle une réaction d'identité partielle.

Une autre γ de faible poids moléculaire ($s_{20,w} = 2.2$ S) est plus riche en substances glucidiques et ne présente qu'une faible réaction d'identité partielle avec les γ 7 S.

WEBB *et al.*⁴, FRANKLIN⁵, ainsi que BERGGÅRD¹³, utilisant des sérum total ou anti γ -globulines plasmatiques, ont montré la présence dans l'urine de deux lignes de précipitation (parfois trois lignes) dont l'une, constante, donne une réaction d'identité immunologique avec les γ -globulines plasmatiques et dont l'autre, diffusant plus rapidement, montre une réaction d'identité partielle. Nos résultats montrent que la première ligne est le fait de γ -globulines 7 S, tandis que l'autre dépend de γ -globulines de plus faible poids moléculaire.

Récemment, BERGGÅRD⁶ a pu obtenir dans l'ultrafiltrat de l'urine et du sérum, une protéine appelée γ -L-globuline, qui présente une réaction d'identité partielle avec les γ 7 S et une plus grande diffusion que celles-ci; son poids moléculaire serait donc inférieur à celui de la protéine 7 S. Toutefois, la constante de sédimentation n'est pas déterminée.

Si l'on peut admettre l'origine plasmatique des γ -globulines urinaires 7 S, celle des 3.5 S et 2.2 S reste hypothétique. Sont-ce des produits de dégradation des γ -globulines plasmatiques, comme le suggèrent WEBB *et al.*⁴ et FRANKLIN⁵? Si cela était, on serait tenté de rapprocher la présence de γ -globulines 3.5 S dans un milieu naturel des fractions obtenues et étudiées par PORTER¹⁴, après hydrolyse des γ -globulines sériques par la papaïne.

RÉSUMÉ

La fraction γ -globuline de l'urine normale, obtenue par précipitation par le sulfate d'ammonium 2 M, suivie d'une chromatographie sur DEAE-cellulose présente plusieurs constituants de poids moléculaire différent. Ceux-ci sont séparés par chromatographie sur Sephadex G-100 en constituants homogènes en ultracentrifugation. La γ -globuline 7 S de l'urine présente les mêmes caractéristiques physico-chimiques et immunochimiques que la γ -globuline plasmatique. La γ -globuline 3.5 S diffère de la γ 7 S par son poids moléculaire et le comportement immunochimique. Enfin, la γ -globuline 2.2 S est faiblement antigénique et plus riche en glucides que les deux autres fractions. Il n'existe pas, dans l'urine de γ -globuline avec une constante de sédimentation inférieur à 2.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. A. RIGAS ET C. G. HELLER, *J. Clin. Invest.*, 30 (1951) 853.
- 2 G. H. GRANT, *J. Clin. Pathol.*, 10 (1957) 360.
- 3 J. C. PATTE, G. BALDASSAIRE ET J. LORET, *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 3 (1958) 960.
- 4 T. WEBB, B. ROSE ET A. H. SEHON, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 36 (1958) 1167.
- 5 E. C. FRANKLIN, *J. Clin. Invest.*, 38 (1959) 2159.
- 6 I. BERGGÅRD, *Clin. Chim. Acta*, 6 (1961) 545.
- 7 R. BOURRILLON, P. CORNILLOT, J. MICHON ET R. GOT, *Clin. Chim. Acta*, sous presse.
- 8 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 9 M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 61.
- 10 J. J. SCHEIDEGGER, *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7 (1955) 103.
- 11 O. OUCHTERLONY, *Progr. Allergy*, 5 (1958) 1.
- 12 T. W. GOODWIN ET R. A. MORTON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 628.
- 13 I. BERGGÅRD, *Clin. Chim. Acta*, 6 (1960) 413.
- 14 R. R. PORTER, *Biochem. J.*, 73 (1959) 119.