

Travail de l'Institut de Chimie médicale (doc. Dr. V. Haberman, C.Sc) et de la Clinique interne (prof. Dr. K. Bobek) de la Faculté de Médecine, Université Charles à Plzeň, Tchécoslovaquie.

UNE METHODE DE DETERMINATION DE LA CAPACITE HISTAMINOPEXIQUE DU SERUM SANGUIN

Par

MARIE CERHOVÁ & LADISLAV ČERNÍK

Les travaux de *Parrot* (4, 6) ont démontré que la capacité du sérum des allergiques de capter l'histamine sur la fraction gamma-globuline est habituellement abaissée. Ce phénomène, la diminution de l'histaminopexie, paraît être un facteur important parmi les perturbations de l'homéostasie qui créent le « terrain allergique » (1, 7).

Parrot utilisait dans ses recherches le test biologique, ce qui entraîne divers désavantages méthodologiques. *Thouvenot et coll.* (10), pour diminuer ces difficultés, travaillent avec une méthode chimique, dont le principe est le suivant (3, 9) :

Une solution de gamma-globuline, isolée par relargage du sérum examiné, est mélangée avec de l'histamine et dialysée contre une solution d'histamine de même concentration. La gamma-globulins, pour autant qu'elle possède la capacité d'histaminopexie, attire la partie correspondante de l'histamine à travers la membrane semi-perméable et, en conséquence, la concentration de l'histamine va augmenter du côté de la solution des gamma-globulines. L'histamine sera ensuite dosée par la para-nitroaniline diazotée.

Le principe de cette méthode est satisfaisant; la méthode donne des résultats reproductibles, mais elle exige de nombreuses manipulations et surtout, la dialyse des protéines à isoler est une opération qui prend du temps. Notons en outre

que certains auteurs (1) ont pu normaliser l'histaminopexie du sang d'allergiques par la dialyse prolongée, on peut supposer que la préparation compliquée des gamma-globulines, nécessaire pour effectuer la méthode de Thouvenot, pourrait l'exposer à certains écarts. C'est pourquoi, nous avons cherché à élaborer une méthode plus simple et mieux adaptée aux impératifs des examens courants.

PRINCIPE

Notre méthode remplace la dialyse par la filtration rapide du sérum à examiner et de l'histamine qui y a été ajoutée, par un filtre moléculaire qui sépare l'histamine fixée sur la protéine d'avec l'histamine demeurée libre. Nous nous servons de la technique de colonne en travaillant avec le G-25 Sephadex (Pharmacia, Uppsala), ralentissant le passage de toutes les molécules jusqu'au poids moléculaire de 5.000.

PREPARATION DE LA COLONNE

La substance sèche de Sephadex est humectée par le l'eau distillée, les fins granules sont enlevés par décantation et le sédiment est lavé à l'eau distillée. A partir du gel ainsi formé, on prépare la colonne de 20 cm de hauteur et de 1,8 cm de diamètre, qu'avant son emploi il faut laver à plusieurs reprises à l'eau. Pour chaque recherche, nous préparons deux colonnes: l'une servira à effectuer la séparation de l'histamine fixée et de l'histamine libre, tandis que dans l'autre, qui doit servir de témoin, nous ferons passer la même quantité de sérum sans y avoir ajouté d'histamine.

PREPARATION DU SERUM

Nous prélevons 5 à 10 ml de sang que nous laissons coaguler durant 30 minutes à la température du laboratoire. On sépare le sérum du caillot par centrifugation à 3.000 tours/min. pendant 15 minutes. Si la recherche ne peut être effectuée immédiatement, il faut conserver le sérum à 10° C.

TECHNIQUE DE RECHERCHE

On dépose 1 ml de sérum dans deux tubes à agglutination et, au premier on ajoute 300 µg de chlorure d'histamine (Merck) dilués dans 0,1 ml d'eau, et au second, 0,1 ml d'eau distillée. On laisse ensuite reposer les deux tubes pendant 5 minutes à la température du laboratoire. L'incubation terminée, on dépose les

deux sérums avec précaution à la surface des deux colonnes de Sephadex, on les y laisse imbiber et on y ajoute encore l'eau distillée avec laquelle les tubes ont été rincés — chaque tube l'ayant été à deux reprises avec 1 ml d'eau distillée. A la fin, on fait l'élution des colonnes imbibées par de l'eau distillée et on récolte de chacune 15 à 16 fractions à 3 ml.

DOSAGE DE L'HISTAMINE

L'histamine réagit avec la para-nitroaniline diazotée en milieu alcalin en donnant une coloration rouge qui peut être évaluée au photomètre.

On ajoute à chaque fraction collectée de la colonne 3 ml d'acide trichloracétique à 20 pour cent, on agite le contenu des tubes et on les laisse pendant 24 heures au réfrigérateur à $+4^{\circ}$ C. L'histamine se libère en 24 heures de la protéine précipitée dans la solution. Le contenu des tubes est ensuite filtré et complété à 10 ml par de l'acide trichloracétique à 10 pour cent. Les tubes contenant le filtrat sont placés dans un bain glacé et, pendant ce temps, on prépare sous réfrigération la para-nitroaniline diazotée en mélangeant 10 ml de solution de para-nitroaniline à 1 pour cent avec 1 ml de nitrite de soude à 4 pour cent fraîchement préparé. On ajoute 1 ml de la solution préparée au filtrat refroidi et puis, progressivement, du carbonate de sodium à 20 pour cent, par doses de 0,05 ml pour atteindre un pH de 7,5. (Nous contrôlons la réaction à l'aide de papier indicateur PHAN). Il faut approximativement 2,3 à 2,5 ml de carbonate pour obtenir le pH désiré et il est indispensable de l'ajouter petit à petit, dose par dose, parce que la neutralisation, en libérant le CO_2 , s'accompagne d'une vive effervescence. Il est en effet indispensable de maintenir constant le pH si l'on désire obtenir des résultats reproductibles. Après la neutralisation, on ajoute à chaque tube 3 ml d'isobutanol et on agite énergiquement. Les phases se séparent, la supérieure, à isobutanol, contenant le produit coloré de la réaction. On la décante et on la met de côté dans un tube sec. On ajoute ensuite, à nouveau, 2 ml d'isobutanol à la prise d'essai primaire, on agite et on ajoute la nouvelle phase supérieure à la première qui avait été mise à part. Pour obtenir de bons résultats, il faut travailler avec un isobutanol de pureté analytique et qui aura été agité au préalable avec le tampon de Michaelis (0.1 M, pH 7,5).

Le dosage de l'histamine est effectué au colorimètre en employant un graphique calibré de 10 à 100 μg . Nous travaillons avec le spectrophotomètre Coleman-Junior et adaptons la densité optique à la longueur d'onde 510 nm.

DOSAGE DES PROTEINES

Nous déterminons la concentration des protéines par la méthode de Lowry (5) où en mesurant le degré de l'absorption dans la zone de 280 nm au UV-spectrophotomètre Zeiss.

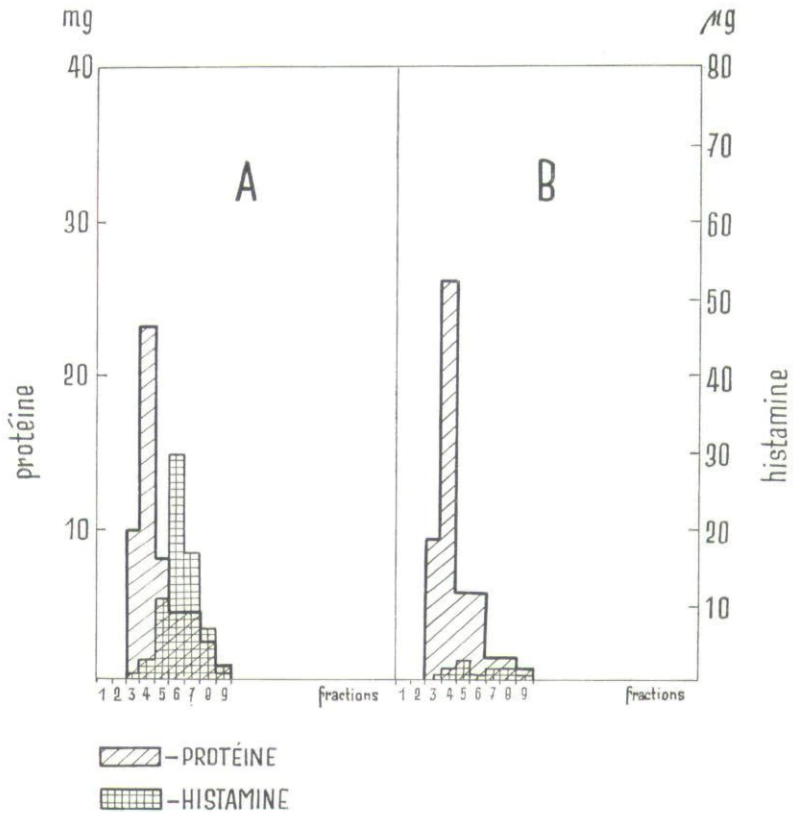


Fig. 1.

Le graphique 1 A représente la détermination de l'histaminopexie dans le sérum d'un patient. En ordonnées, les valeurs de la protéine et de l'histamine, en abscisse le nombre des fractions collectées de la colonne.

Le graphique 1 B représente l'examen de la colonne de contrôle.

RESULTATS ET INTERPRETATION

Le pouvoir histaminopexique est représenté par l'addition des quantités d'histamine de toutes les fractions contenant de la protéine.

La Fig. 1 représente les résultats d'une détermination. Le graphique A (sérum incubé avec histamine) montre que le sommet de la courbe de l'histamine fixée se trouve près du

sommet de celle de la protéine mais que les deux sommets ne coïncident pas. Ce phénomène est dû vraisemblablement à l'affinité de l'histamine pour la substance de la colonne, le passage par la colonne du complexe protéine-histamine étant ainsi ralenti.

Nous avons estimé nécessaire de faire parallèlement des épreuves de contrôle parce que le sérum peut contenir des substances qui, comme l'histamine, donnent des dérivés de coloration semblable avec la para-nitroaniline. Nous avons retrouvé cette coloration au cours de ces épreuves de contrôle et, bien qu'elle fût minime, nous l'avons déduite du résultat de l'épreuve-même pour conserver à celle-ci toute la précision de la méthode. Le *graphique B* (Fig. 1) montre la relation quantitative entre ces substances perturbatrices et la réaction de l'histamine.

L'histamine libre reste fixée dans la colonne. On peut s'en assurer en effectuant la réaction à la para-nitroaniline sur la colonne elle-même. La quantité d'histamine qui sort avec les protéines du même sérum de la colonne demeure constante même si, comme nous l'avons fait, on en ajoute une plus grande quantité dans la réaction; la capacité de la colonne est suffisante pour capter toute l'histamine libre.

L'écart de la méthode n'est pas grand. Nous l'avons déterminé en répétant dix fois la recherche de l'histaminopexie dans le sérum d'un même donneur. (Ce patient possédait un pouvoir moyen d'histaminopexie, captant en moyenne 23,82 pour cent d'histamine, en comptant comme 100 pour cent les 300 μ g d'histamine que nous ajoutons à 1 ml du sérum). En raison de la petite dispersion des déterminations particulières ($\sigma = 2,9525$ pour cent $\sigma_M = 0,2953$ pour cent), on peut accepter comme véridiques les valeurs moyennes constatées.

Parce que nous travaillons, à la différence de la méthode de Thouvenot, avec le sérum complet et non pas avec des globulines isolées, il a fallu que nous nous assurions si les autres fractions protéiniques du sérum sanguin ne participaient pas, elles aussi, à la fixation de l'histamine, étant capables éventuellement de la capter mais sans pouvoir en inactiver les ef-

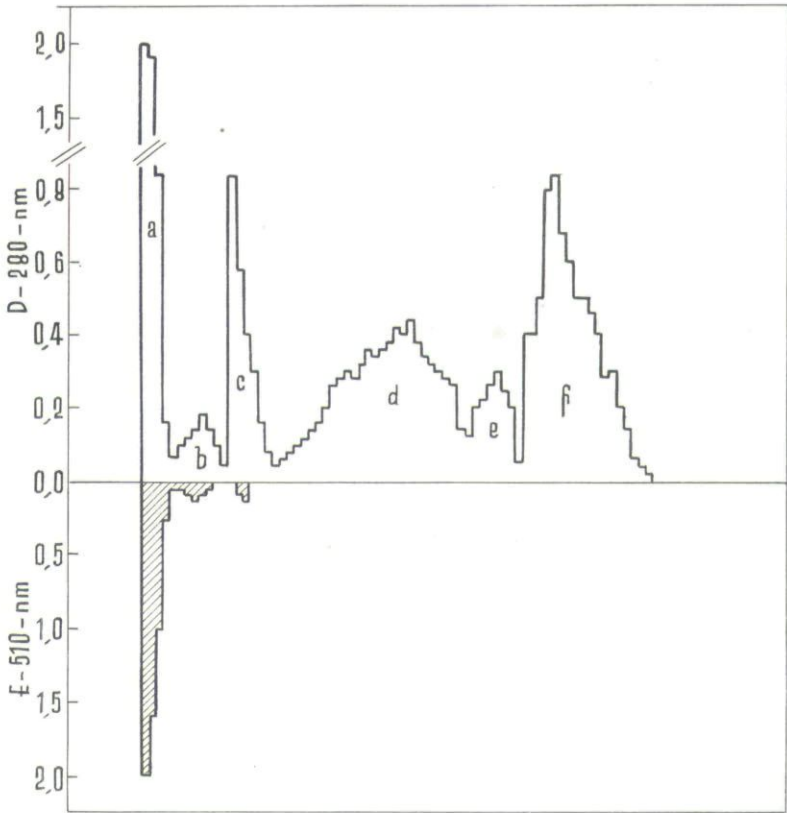


Fig. 2.

Le graphique représente la division chromatographique des protéines sériques, avec l'histamine qui y est fixée sur la colonne de DEAE cellulose. Au dessus de l'abscisse, les valeurs de la protéine, exprimées en UV absorption; au dessous, les valeurs de l'histamine. Les sommets sont désignés par les lettres a à f, la gamma-globuline correspondant surtout au sommet a.

fets. C'est pourquoi, nous avons effectué plusieurs essais de séparation des protéines des sérums incubés avec l'histamine sur la colonne de DEAE-cellulose, en employant la méthode de *Sober et coll.* (8).

5 ml de sérum, après dialyse pendant 18 heures contre un tampon phosphate (0,005 M, pH 7,1), sont incubés avec 1,5 mg d'histamine et portés sur la colonne DEAE-cellulose aux dimensions de $2,5 \times 50$ cm. La division s'opère par le

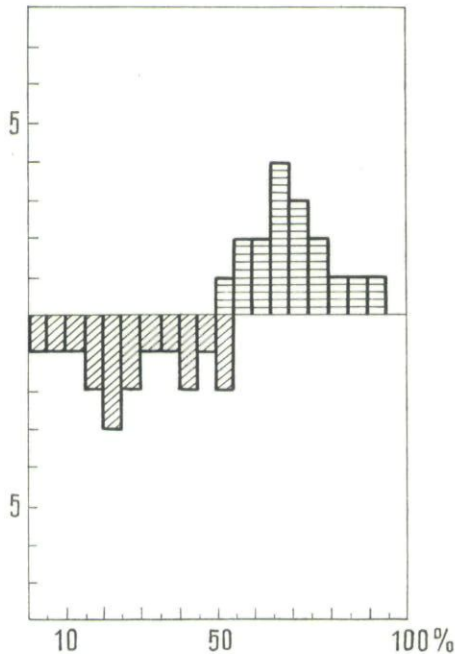


Fig. 3.

L'histogramme montre la distribution des valeurs de l'histaminopexie chez les témoins sains (au dessus de l'axe) et chez les allergiques (au dessous). La valeur moyenne chez les sains est 68,97 pour cent ($\sigma = 14,64$, $\sigma_M = 3,55$), chez les allergiques 29,70 pour cent ($\sigma = 14,88$, $\sigma_M = 3,61$).

gradient progressif du tampon phosphate et par concentration ascendante de NaCl. On récolte des fractions de 10 ml de la colonne et dans chacune, les protéines et l'histamine sont dosées.

Le résultat est indiqué sur le graphique (Fig. 2). La gamma-globuline ne se fixe sur la colonne que très faiblement, et en est éluée sous l'effet d'une solution faible (0,005 à 0,02 M, tampon phosphate à pH 6-7). On note aussi que l'histamine sort de la colonne en sa totalité avec la fraction gamma-globuline. Il est probable que même la minime quantité d'histamine, qu'on aperçoit dans les zones des sommets b et c, est fixée à la gamma-globuline, parce qu'on peut aussi déceler, par électrophorèse ou par immunoprécipitation, de petites quanti-

tés de gamma-globuline dans ces fractions. On peut en conclure, qu'en dehors des gamma-globulines, les autres fractions protéiniques du sérum sanguin ne modifient pas les résultats de notre méthode.

Celle-ci a été vérifiée entre temps par une série d'examen comprenant 17 allergiques (Tableau 1) et 17 individus sains.

TABLEAU 1
Malades avec affections allergiques : valeurs de l'histaminopexie.

Nom	Age	Sexe	Diagnostic	Valeur de l'histaminopexie (%)
1. A.Č.	58	♀	Pyélonéphrite chronique, Shock allergique après Diodon á 35% (i.v.)	3,1
2. J.H.	54	♂	Eczéma généralisé	40,6
3. F.M.	58	♂	Asthme bronchique	29,5
4. K.H.	53	♂	Asthme bronchique	19,6
5. J.K.	19	♂	Oedème de Quincke	30,0
6. A.V.	64	♀	Taenia avec urticaire et arthralgies fugaces	39,3
7. V.S.	64	♂	Réaction (fragmentaire) après procaine-pénicilline, cirrhose du foie	41,8
8. J.N.	58	♂	Réaction (fragmentaire) après procaine-pénicilline, pneumonie	53,0
9. B.F.	53	♀	Etat de mal asthmatique	9,3
10. A.Š.	64	♂	Asthme bronchique	16,3
11. J.Š.	45	♂	Asthme bronchique	24,0
12. M.S.	32	♀	Oedème de Quincke	54,0
13. M.C.	32	♀	Oedème de Quincke	34,7
14. B.Š.	40	♂	Allergie alimentaire	47,0
15. M.K.	45	♀	Urticaire	25,3
16. A.P.	35	♀	Eczéma	13,6
17. A.D.	54	♀	Oedème de Quincke	23,8

L'histogramme (Fig. 3) en présente les résultats, témoins au-dessus, allergiques au-dessous de l'axe. On voit que les valeurs de l'histaminopexie des allergiques n'atteignent habituellement pas 50 pour cent, tandis que chez les normaux, les sérums sont capables de fixer de grandes quantités d'hista-

mine, dépassant même le taux qu'on rencontre à l'état physiologique. Tous les intermédiaires s'y retrouvent depuis les valeurs les plus hautes jusqu'aux plus basses, ce qui confirme l'opinion de *Benda* (2) postulant l'existence d'un « terrain labile ».

CONCLUSIONS

La méthode est basée sur l'utilisation d'un filtre moléculaire dextrane (Sephadex) qui, grâce à sa structure, possède la capacité de laisser passer librement les substances macromoléculaires et de ralentir le passage des micromolécules. L'histamine fixée sur la protéine du sérum sanguin passera donc avec celle-ci autour des grains du gel du Sephadex; par contre, l'histamine libre sera arrêtée dans la colonne par l'effet de deux facteurs: 1) chaque substance micromoléculaire (le poids moléculaire de l'histamine est III, 15), qui entre dans le réseau de la structure dextrane du Sephadex, y est ralentie, 2) – et c'est l'aspect important de notre méthode – la substance du Sephadex, ayant une haute teneur en groupes – OH, possède un caractère fortement polaire. L'histamine, étant un composé hétérocyclique avec groupes basiques, est dotée d'une haute affinité pour la substance même du Sephadex et elle ne pourra être éluée de la colonne que par l'application de solutions de puissance ionique plus élevée.

La méthode s'avère satisfaisante. Ainsi qu'on peut le constater, malgré le nombre réduit de nos examens, nos résultats sont comparables à ceux obtenus avec d'autres méthodes, la distribution des valeurs s'accordant, p. ex. avec celle de *Benda* (2) et *Hlasivcová* (3). Elle a surtout l'avantage, en remplaçant la dialyse par une filtration moléculaire, de supprimer la lenteur des méthodes actuelles.

Le travail de laboratoire prend 90 minutes, plus 24 heures pour l'extraction de l'histamine de la protéine. L'écart du dosage n'est pas grand.

Nous remercions Mme *V. Vališová* et Mme *M. Seidlová* pour leur collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Baláž, V.*: Význam histaminopexie plazmy v patogenéze alergie. Čas. Lék. čes. XCIX/46 LZ IV/11, 251, 1960.
2. *Benda, R.*: Généralités sur l'histaminoprotection et les sérums protecteurs. Sem. Hôp. Paris 39/41-42, 1884, 1963.
3. *Hlasivcová, V.*: Histaminopexie u alergické rýmy. Čas. Lék. čes. CIII/36, 977, 1964.
4. *Laborde, C., Parrot, J. L. & Urquia, D. A.*: Le pouvoir histaminopexique du sérum sanguin. Technique de mesure. Presse méd. 57, 1151, 1953.
5. *Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.*: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
6. *Parrot, J. L. & Laborde, C.*: Le pouvoir histaminopexique du sérum sanguin. Son absence chez les sujets allergiques. Presse méd. 63, 1268, 1953.
7. *Parrot, J. L. & Laborde, C.*: Études sur le terrain allergique. Presse méd. 77, 1765, 1956.
8. *Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckoff, M. M. & Peterson, E. A.*: Chromatography of Protein. J. Amer. chem. Soc. 78, 756, 1956.
9. *Starý, O., Vymazal, J. & Procházková, Z.*: Sledování histaminopexie u roztroušené sklerózy mozkomíšní. Čsl. Neurol. XXIV/6, 361, 1961.
10. *Thouvenot, J., Flavian, N. & Weber, R.*: Bull. Soc. chim. biol. (Paris) 39, 1511, 1957 (cité chez 3 et 9).

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.