

Dosage des protéines dans le sérum sanguin,

PAR

Lucien A. LOUIS.

(Reçu pour publication le 14 juillet 1951.)

Parmi les nombreuses méthodes utilisées pour le dosage des protéines sériques, nous en avons retenu deux : celle basée sur la réaction du biuret et la méthode réfractométrique, qui nous ont paru les plus simples, tout en fournissant des résultats suffisamment précis pour les besoins cliniques. La méthode de Kjeldahl, généralement considérée comme la meilleure, prend trop de temps pour de nombreuses déterminations en série et la méthode de Greenberg est moins simple.

PRINCIPES.

1. La méthode réfractométrique.

L'indice réfractométrique d'un sérum sanguin est fonction de sa teneur en protéines. L'expérience montre que, dans la limite des valeurs habituellement trouvées dans le sérum, cette fonction est linéaire et peut se traduire par la formule

$$n = a C + K \quad (1)$$

où n est l'indice de réfraction et C la concentration, a est une constante de proportionnalité égale à la variation de l'indice de réfraction pour une variation de concentration égale à l'unité. K est égal à n , quand $C = 0$; en d'autres termes, c'est l'indice de réfraction d'un sérum sans protéine.

Pour une température donnée et chez l'homme, la valeur de a

ne varie guère d'un sérum à l'autre et est d'ailleurs la même pour les albumines et pour les globulines. D'autre part, les variations des constituants non protéiques du sérum, même dans les cas pathologiques, ne sont jamais assez importantes que pour entraîner une modification notable du facteur K. Il en résulte que, moyennant la détermination des valeurs de a et de K, la concentration des protéines dans le sérum peut se déduire de l'indice de réfraction.

En accord avec les chiffres de Reiss (1), on a, à la température de 20°C., les valeurs de 0,001945 pour a et 1,33501 pour K, la concentration étant exprimée en grammes pour cent. La formule devient

$$n = 0,001945 C + 1,33501$$

d'où
$$C = \frac{n - 1,33501}{0,001945} \quad (2)$$

Pour des températures comprises entre 20°C. et 28°C., la valeur de a ne se modifie pas. Seul K change. On peut déterminer K par la formule

$$K = 1,33721 - 0,00011 \cdot t$$

où t est la température en degrés C.

2. La méthode du réactif du biuret.

La formation d'un complexe de coloration rouge, lorsqu'on ajoute du sulfate de cuivre à une solution alcaline de protéines, fut utilisée d'abord par Riegler (2) pour l'estimation des protéines de l'urine.

Les travaux d'Autenrieth (3, 4), Hiller (5) et Fine (6) montrent l'intérêt de cette réaction et apportent la preuve que les albumines et les globulines ont une même extinction spécifique. Les travaux ultérieurs de Robinson et Hogden (7, 8), de Kingsley (9, 10), de Weichselbaum (11) et de Gornall, Bardawille et David (12) tendent à améliorer la méthode en supprimant la précipitation préalable des protéines en améliorant la conservation du réactif en le modifiant de façon à éviter la formation d'un

précipité lors de l'analyse, et en adaptant la technique au photocolorimètre qui dispense de la préparation laborieuse d'un standard à chaque détermination.

A la suite de Weichselbaum, Gornall et al. stabilisent le réactif du biuret par addition de tartrate sodicopotassique et d'iodure de potassium. Le tartrate forme un complexe stable et bien soluble avec les ions cuivriques et évite leur précipitation en solution fortement alcaline. L'iodure de potassium prévient « l'autoréduction » des ions cuivriques; en fait cette autoréduction est due à la présence d'impuretés dans les réactifs et on sait que l'iodure de potassium favorise la réoxydation du cuivre réduit. Les lectures se font au photocolorimètre aux environs de 540 millimicrons, où se trouve le maximum d'absorption du complexe cuivre-protéines.

TECHNIQUES.

1. *La méthode réfractométrique.*

Les mesures sont faites à la température de $20^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C.}$, au moyen d'un réfractomètre de Zeiss (Eintauch Refraktometer), équipé d'un prisme I et muni d'un bain-marie contenant 12 cuvettes cylindriques. Une de ces cuvettes est remplie d'eau distillée et sert à l'étalonnage lors de chaque détermination. Lorsqu'on ne dispose que de petites quantités de sérum, on se sert de cuvettes spéciales qui n'exigent que deux gouttes de liquide. A partir de la formule (2), on dresse un tableau qui donne directement la teneur en protéines en fonction des indications de l'échelle conventionnelle de l'appareil.

2. *La méthode du réactif du biuret.*

Réactifs.

1. On dissout 6 gr. de tartrate sodicopotassique ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dans environ 250 ml. d'eau.
2. On dissout d'autre part 1,5 gr. de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans environ 100 ml. d'eau.
3. On verse lentement, en agitant, la solution de sulfate de cuivre dans la solution de tartrate, puis on transfère dans un ballon jaugé de 1000 ml.

4. On ajoute, en agitant, 300 ml. de soude caustique 2,5 N (10 %).
5. On ajoute 1 gr. d'iodure de potassium (KI) et on agite jusqu'à dissolution.
6. On complète à 1000 ml. au moyen d'eau distillée.

Remarques.

1. Gornall et al. (12) recommandent de dissoudre en même temps le sulfate de cuivre et le tartrate dans l'eau. Suivant notre expérience, il peut rester un résidu insoluble.
2. La soude caustique doit être exempte de carbonate. On la prépare, au moment de l'emploi, par dilution d'une solution concentrée (environ 50 %) où le carbonate de sodium est peu soluble.
3. Le réactif correctement préparé et mis en bouteille paraffinée bien bouchée est de bonne conservation. Cependant, si un précipité apparaît, il doit être renouvelé.

DOSAGE.

1. Le sérum à analyser est dilué à 1/20 au moyen de chlorure de sodium 0,85 %.
2. Dans une cuvette colorimétrique, on met 2 ml. de sérum dilué.
3. Dans une autre cuvette, on met 2 ml. d'eau.
4. A chaque cuvette, on ajoute 8 ml. de réactif et on mélange.
5. On laisse reposer 30 minutes.
6. Les lectures sont faites au spectrophotomètre à 540 millimicrons, la transmission étant réglée à 100 % sur le blanc.
7. La concentration en protéines est déduite de la courbe d'étalonnage.

Remarques.

1. La coloration se développe rapidement et reste pratiquement constante après 30 minutes. Après 60 minutes, il peut apparaître un précipité.
2. Comme Gornall et al. (12) l'ont noté, l'influence de la température sur le développement de la coloration n'est pas importante. Il faut cependant éviter de travailler à des températures différant de plus de 5°C. de la température qui a servi à l'établissement de la courbe d'étalonnage.
3. On peut éviter la dilution préalable du sérum et ajouter directement 0,1 ml. de sérum à 10 ml. d'un réactif préparé en mélangeant 8 volumes du réactif précédemment décrit à 2 volumes d'eau. Si l'on procède de cette manière, il n'est pas nécessaire de modifier la courbe d'étalonnage.

Etalonnage.

Le biuret ne peut convenir à la confection des standards. Difficile à obtenir à l'état pur, il donne une coloration qui diffère de celle des protéines. Les standards seront donc faits à partir de

solutions de protéines de concentrations connues. Comme d'autre part, toutes les protéines ne donnent pas la même intensité de coloration dans les mêmes conditions, on doit se servir de sérums.

1. Sur un sérum normal, on détermine la teneur en protéines. Le dosage de l'azote protéique — différence entre l'azote total et l'azote non protéique — par la méthode de Kjeldahl, paraît le mode le plus sûr de détermination.

2. On dilue ce sérum au moyen de NaCl à 0,85 %, de façon à obtenir des concentrations de 150, 300, 450 et 600 mgr. %.

3. Dans des cuvettes colorimétriques, on met 2 ml. de chacune de ces dilutions et dans une dernière cuvette 2 ml. d'eau.

4. On ajoute 8 ml. de réactif et on mélange.

5. On laisse reposer 30 minutes à la température où se feront les déterminations ultérieures.

6. On lit les extinctions ou les transmissions au spectrophotomètre à 450 millimicrons. Elles correspondent respectivement à des concentrations en protéines de 3, 6, 9 et 12 grammes pour cent.

Remarques.

1. La courbe d'étalonnage est établie sur les moyennes de 3 sérums.
2. La réaction obéit aux lois de Lambert et de Beer. Nous avons trouvé que $C = 21,3 \cdot d \cdot E$; C étant la concentration en gr. %, d la longueur en cm. des cuvettes utilisées et E l'extinction lue.

DISCUSSION.

1. *La méthode réfractométrique.*

Les lectures au réfractomètre se font sans peine à 0,1 unité près de l'échelle conventionnelle de l'appareil, ce qui correspond à 0,000.04 de l'indice de réfraction et 0,02 gr. % de la teneur en protéines. Pour des concentrations de l'ordre de 7 gr. %, l'erreur relative est de 0,3 % environ.

L'erreur due à des variations de température est un peu plus importante. Des formules (2) et (3), on tire qu'une erreur de 1° sur la détermination de la température, entraîne une erreur de 0,11 gr. % sur la concentration en protéines soit une erreur relative d'environ 1,5 %.

2. *La méthode du réactif du biuret.*

Le dosage se faisant directement sur le sérum et la technique ne comportant qu'un petit nombre de mesures de volume, on peut s'attendre à une bonne reproductibilité.

Sur 10 séries de déterminations faites sur 4 sérums dont la teneur en protéines était comprise entre 6,7 gr. % et 9,1 %, nous avons trouvé une erreur absolue maxima de 0,25 gr. %, l'erreur moyenne étant de 0,075 gr. %, soit une erreur relative maxima de 3,2 % et une erreur relative moyenne de 1 %.

Signalons d'autre part, que Gornall et al. (12) ont trouvé entre leur méthode et la méthode de Kjeldahl des différences maxima de 0,2 %.

3. *Comparaison entre les deux méthodes.*

Sur 100 sérums pris au hasard et provenant de malades consultants ou hospitalisés de la Clinique Léopold II, les protéines totales ont été déterminées par les deux méthodes.

La moyenne des chiffres obtenus par la méthode réfractométrique est de 7,57 gr. %, alors que le biuret donne une moyenne de 7,58 gr. %. Les valeurs extrêmes vont de 6,16 gr. % à 9,45 gr. %.

La moyenne des différences entre les chiffres obtenus par les deux méthodes est de $\pm 0,10$ gr. %. Dans 63 % des déterminations, la différence est inférieure à 0,25 gr. % et dans 97 % à 0,5 gr. %. Dans les trois autres déterminations, on trouve des différences de $- 0,54$, $- 0,61$ et $- 0,66$ gr. %.

Les différences les plus marquées ne semblent pas liées à une altération particulière du sérum, mais bien plutôt à des erreurs accidentelles. Si l'on tient compte, d'une part, des possibilités d'erreur mises en évidence pour la méthode du réactif du biuret — erreur maxima de 0,25 gr. % dans une série de déterminations et désaccord de 0,2 gr. % avec la méthode de Kjeldahl signalé par Gornall — et d'autre part, du fait que toutes ces déterminations font partie du travail courant de laboratoire, on doit conclure que l'accord des deux méthodes est satisfaisant.

Conclusions.

La méthode réfractométrique et la méthode basée sur la réaction du biuret paraissent également satisfaisantes pour la détermination du taux des protéines sériques. Cependant si l'on dispose d'un bon réfractomètre, muni d'un bain-marie à température bien constante, nous croyons que la méthode réfractométrique est la méthode de choix. Non seulement elle est la plus rapide, mais du fait même de sa simplicité, elle n'expose guère à des erreurs de technique. N'impliquant ni réactif, ni mesure de volume, elle élimine ces causes d'erreur toujours possibles et qui existent notamment pour la méthode au réactif du biuret. Applicable sur de petites quantités de sérum, elle a de plus l'avantage de laisser inaltérés des échantillons qui pourront servir à d'autres analyses. Et nous croyons qu'elle a un champ d'application tout indiqué à la Colonie, où elle permettra sans peine des déterminations sur de grandes séries.

RÉSULTATS.

L'étude des résultats obtenus dans une série de déterminations n'est jamais chose simple. Il peut sembler, en effet, qu'il suffise de comparer ces résultats avec les chiffres « normaux » fournis par les auteurs qui ont étudié la question, pour pouvoir résoudre ce problème. Cette manière de faire n'est cependant pas possible, car les moyennes publiées sont le plus souvent différentes, ce qui tient manifestement aux procédés employés pour les dosages. Chaque technique, chaque matériel, chaque opérateur possède ses erreurs systématiques d'autant plus considérables que l'analyse est de mise au point plus difficile et qu'elle porte sur des quantités plus petites de produits à déterminer, ce qui est généralement le cas dans les dosages biologiques.

D'autres difficultés particulières peuvent encore compliquer la solution du problème. Ainsi lorsqu'il s'agit de protéines, on ne procède pas, *sensu stricto*, au dosage des protéines totales, mais bien de l'un ou l'autre de leurs constituants : azote dans la méthode de Kjeldahl, acides aminés à noyau phénol dans la méthode de Greenberg, propriétés chimiques ou physiques assez mal déterminées dans la technique du réactif du biuret ou dans

la méthode réfractométrique. Bien que l'accord entre ces diverses méthodes soit satisfaisant et suffise dans l'étude d'un cas clinique particulier, les divergences restent pourtant assez importantes pour fausser des statistiques qui, on peut le supposer a priori, ne mettront en évidence que des différences minimales.

Enfin, pour ce qui est des protéines, l'établissement de standards sûrs est impossible, ce qui empêche le contrôle des résultats obtenus et la détection des erreurs systématiques.

Dans ces conditions, nous estimons qu'une étude statistique portant sur les seuls résultats obtenus dans un laboratoire donné, par le même opérateur, utilisant toujours la même technique et le même matériel et préparant ses réactifs d'une manière aussi constante que possible avec des produits identiques, peut seule apporter une solution au problème.

La difficulté d'une telle étude est de trouver un nombre suffisant de sujets normaux sur lesquels on puisse établir ses normes. Le plus souvent la chose n'est pas possible, mais il n'empêche que l'on doit s'efforcer d'atteindre cet idéal.

Aperçu général.

Dans notre série de déterminations, nous ne disposons pas d'un assez grand nombre de résultats se rapportant à des sujets normaux, n'ayant jamais séjourné en Afrique. Aussi pour pouvoir établir des normes, nous sommes forcé de procéder par approximations successives. Nous avons pour cela étudié 3 groupes de plus en plus importants.

Le premier groupe est constitué de 14 résultats typiques, sujets normaux n'ayant jamais quitté l'Europe.

Le deuxième groupe est formé de 60 sujets, ayant séjourné moins de 6 ans à la Colonie et ne présentant pas d'affection qui s'accompagne d'une variation significative du taux des protéines sériques.

L'étude de ces deux groupes nous ayant montré qu'il n'existe entre eux aucune différence significative, nous sommes autorisé à considérer les résultats obtenus comme répondant à la normale et à sélectionner dans l'ensemble des résultats, ceux qui répondent à ces normes et qui constitueront le *troisième groupe*. La correspondance existant entre les chiffres obtenus pour ce troi-

sième groupe et pour les deux groupes précédents montré la validité de ce raisonnement.

Le premier groupe donne pour la moyenne des déterminations 7,69 gr. %. Les chiffres vont de 6,85 gr. % à 8,67 gr. %. La déviation standard est 0,40 gr. %. Six chiffres sont en-dessous de la moyenne, alors que huit sont au-dessus. Douze chiffres diffèrent de moins de deux déviations standards de la moyenne, un chiffre diffère de 2,1 et un de 2,44 déviations standards.

Le deuxième groupe donne pour la moyenne des déterminations 7,59 gr. %, les extrêmes étant 6,29 gr. % et 8,67 gr. %. La déviation standard est 0,55 gr. %. 53 % des résultats sont en-dessous de la moyenne, 47 % sont au-dessus. Trois résultats diffèrent de plus de 2 déviations standards de la moyenne 2,45, 2,27 et 2,08.

La comparaison de ces deux séries de résultats montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux moyennes 7,69 gr. % et 7,59 gr. %. La déviation standard est plus élevée dans la série de 60 déterminations. Mais étant donné le nombre restreint de déterminations dans le premier groupe, il est très probable que cette plus grande dispersion n'a pas de signification particulière.

Arrivé à ce point, on peut admettre que des chiffres inférieurs à 6,5 gr. % ou supérieurs à 8,7 gr. %, ce qui correspond à des différences de deux déviations standards avec la moyenne ont beaucoup de chance d'être pathologiques.

Comme on sait que des valeurs différant de plus de 2,5 déviations standards de la moyenne n'ont que très peu de chance d'être encore normales, nous avons alors repris dans l'ensemble des résultats tous les chiffres compris entre 6,0 gr. % et 9,2 gr. %. Nous avons de plus éliminé systématiquement tous les chiffres se rapportant à des noirs que nous avons groupés dans une autre série de comparaison. Nous sommes ainsi amenés à retenir 331 chiffres qui constituent le troisième groupe, sur lequel nous avons de nouveau déterminé la moyenne et la déviation standard.

La moyenne est 7,68 gr. %. La déviation standard est de 0,59 gr. %. On voit que la moyenne rejoint les chiffres précédemment trouvés. La déviation standard est un peu plus élevée,

mais les chiffres extrêmes sont aussi plus éloignés de la moyenne. Il est cependant justifié de retenir ces chiffres; en effet, comme le montre le graphique I, les valeurs différant de la moyenne de plus de deux déviations standards représentent environ 5 % des résultats, ce qui est peu différent de la courbe théorique normale où l'on trouve 3 à 4 %.

L'accord entre les trois groupes est satisfaisant et l'on peut considérer que les résultats obtenus sur le troisième groupe, le plus abondant, correspondent à des valeurs normales.

L'étude de la courbe de répartition montre aussi que la plus grande fréquence tombe un peu en-dessous de la moyenne. On en trouve l'explication si l'on observe que, entre +1 et +1,5 déviation standard, il existe une fréquence plus élevée que celle à laquelle on s'attendrait (13,3 % au lieu de 7 % dans une courbe normale). Cependant, ces différences sont minimes et nous ne croyons pas qu'il faille s'y arrêter.

Sans vouloir attribuer à ces chiffres une valeur que ne peut donner la méthode par approximation que nous nous sommes vu forcé d'adopter, on peut cependant en tirer de bonnes valeurs de base pour l'étude du taux des protéines totales *par la méthode que nous avons employée*.

Influence du sexe.

Etant donné que les sujets dont nous avons étudié le sérum sont en majorité des hommes, on peut se demander si les irrégularités signalées dans la courbe ne sont pas liées au sexe. En fait nous trouvons sur 207 hommes une moyenne de 7,7 gr. % et sur 124 femmes une moyenne de 7,67 gr. %. La différence est donc insignifiante.

Influence de la durée du séjour en Afrique.

Nous avons recherché si la durée du séjour en Afrique a une influence sur le taux des protéines totales du sérum. Le graphique II résume les résultats. En abscisse se trouve le nombre d'années de séjour, les résultats étant groupés de trois en trois ans, tandis que les chiffres se rapportant à des sujets ayant séjourné plus de 21 ans en Afrique sont rassemblés en un seul

groupe. En ordonnée se trouvent les moyennes pour chacun de ces groupes.

On voit d'abord qu'il n'existe aucune modification systématique, soit dans le sens d'une augmentation, soit dans le sens d'une diminution. D'autre part si l'on compare les différences entre ces moyennes partielles et la moyenne générale de 7,69 gr. %, en tenant compte du nombre de déterminations dans chaque groupe, on ne trouve aucune différence significative. En effet, on sait que, pour qu'une différence ait 96 à 97 chances sur 100 d'être significative dans un groupe de n déterminations, il faut qu'elle atteigne une valeur de $2 DS/\sqrt{n}$ où DS est la déviation standard d'un groupe de référence. Ce groupe de référence devrait être constitué par les sujets normaux n'ayant jamais séjourné à la Colonie. Ce groupe étant trop peu important, nous avons adopté comme référence les résultats obtenus sur l'ensemble des déterminations. Bien qu'en procédant de cette manière, nous introduisions sans doute une erreur, celle-ci doit rester petite et nous pouvons au moins obtenir un ordre de grandeur. La déviation standard de l'ensemble des résultats étant 0,59 gr. %, on trouve que la plus grande différence observée atteint seulement la valeur de DS/\sqrt{n} . Compte tenu de l'erreur que nous avons pu introduire en nous référant à l'ensemble des résultats, cette différence ne peut être considérée comme significative et on peut conclure que la durée du séjour en Afrique est sans influence sur le taux des protéines sériques.

Les Noirs.

Sur les sérums de Noirs, nous avons obtenu des résultats fortement différents. Sur 8 sérums, on trouve une moyenne de 9,45 gr. %, la déviation standard étant 0,72 gr. %. La différence avec la moyenne de l'ensemble 7,69 gr. % est 1,76, soit $8,5 DS/\sqrt{n}$. Il ne fait pas de doute que, malgré le petit nombre de déterminations, cette différence ne soit significative. Il faut aussi noter que rien, dans les affections que présentaient ces indigènes, ne pouvait faire supposer une telle augmentation des protéines sériques. Cependant nous devons remarquer que tous ces Noirs sont des marins, dont la plupart naviguent depuis

de nombreuses années, qu'ils font l'objet d'une sélection sévère lors de l'enrôlement et qu'ils ont une nourriture qui se rapproche beaucoup de la nourriture des marins européens. Il ne peut donc être question d'extrapoler ces résultats à la majorité des Noirs vivant au Congo, mais il y a là une indication intéressante à retenir.

CONCLUSIONS.

1. Le taux moyen des protéines totales, déterminé par la méthode du réactif du biuret telle que nous l'avons employée, est chez l'Européen de 7,7 gr. %. Les chiffres inférieurs à 6,5 gr. % ou supérieurs à 8,9 gr. % ont 95 % de chance d'être pathologiques, tandis que les chiffres inférieurs à 6,0 gr. % ou supérieurs à 9,2 gr. % peuvent être considérés comme certainement pathologiques.
2. Le taux des protéines totales n'est pas influencé par le sexe.
3. La durée du séjour en Afrique est sans influence sur le taux de protéines du sérum.
4. Les Noirs ayant adopté un mode de vie proche de celui des Européens ont un taux de protéines totales élevé, atteignant 9,45 gr. %. Un contrôle portant sur un nombre plus élevé de déterminations serait nécessaire.

*Clinique Coloniale Léopold II,
(Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold),
Anvers.*

Samenvatting. — Schrijver vergelijkt het gebruik van de refractometrische methode en van de Biuret-reactie voor het doseren der proteïnen in het bloedserum. De twee methoden geven voldoening maar de eerste wordt aanbevolen voor haar snelheid en eenvoudigheid. Schrijver concludert dat :

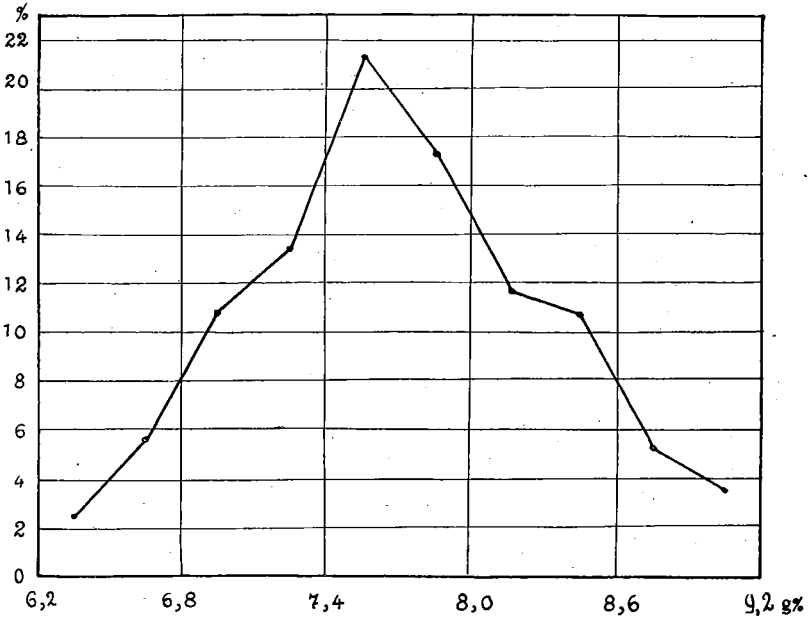
1. Het Proteïnegehalte bij de Europeanen noch door het geslacht noch door de duur van verblijf in Africa beïnvloed wordt.

2. De Zwartten die een meer europese levenswijze hebben aangenomen, een hoog proteïnegehalte bezitten dat 9,45 gr. % kan bereiken.

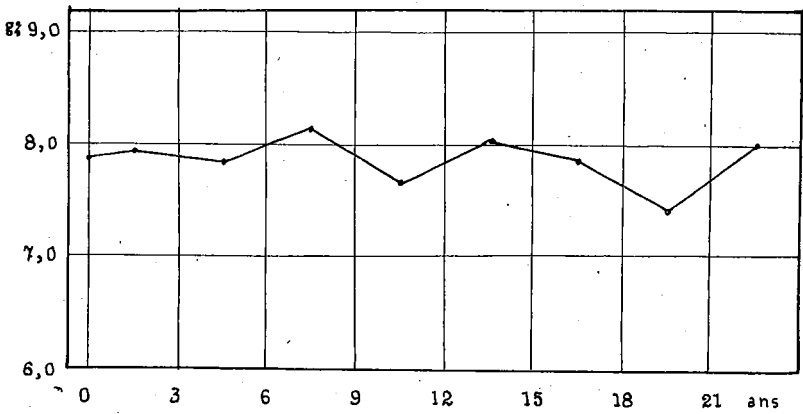
Schrijver denkt dat bij de Europeanen een gehalte hoger dan 9,2 gr. % of lager dan 6,09 gr. % pathologisch is. Hij wenst contrôles te doen bij een groter getal Zwartten.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Reiss. 1924. In Abderhalden, Hdb. d. Biol. Arbeitsmeth., Abt 4, T. 3.
2. Riegler, E. Z. Anal. Chem., 53, 242, 1914.
3. Autenrieth, W., & Minck, F. Münch. Med. Woch., 62, 1417, 1915.
4. Autenrieth, W. Münch. Med. Woch., 64, 241, 1917.
5. Hiller, A. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 24, 385, 1927.
6. Fine, J. Biochem. J., 29, 799, 1935.
7. Robinson, H. W., & Hogden, C. G. J. Biol. Chem., 135, 707, 1940.
8. Idem. J. Biol. Chem., 135, 727, 1940.
9. Kingsley, G. R. J. Biol. Chem., 131, 197, 1939.
10. Idem. J. Lab. Clin. Med., 27, 840, 1942.
11. Weichselbaum, T. E. Am. J. Clin. Path., 10, 40, 1946.
12. Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. J. Biol. Chem., 177, 751, 1949.



Protéines totales. — Graphique I.



Protéines totales. — Graphique II.