

50.376 N° d'ordre
1965
19

50376
1965
19

Université de Lille — Faculté des Sciences

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

JEAN AGNERAY

Première Thèse

Fractionnement des Protéines du Sèrum Sanguin à l'aide de l'Acide Inositohexaphosphorique

Soutenue le 25 Novembre 1965, devant la Commission d'Examen

JURY : MM. les Professeurs J. MONTREUIL, Président
J. GERMAIN
G. BISERTE
J. E. COURTOIS



1965

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE.

- Doyens Honoraires : MM. LEFEBVRE, PRUVOST.

 - Professeurs Honoraires : MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, WIEMANN ZAMANSKY.
-

- Doyen : TILLIEU, Professeur de Physique.

- Assesseurs : M. DURCHON, Professeur de Zoologie.
M. HEUBEL, Professeur de Chimie Minérale.

- Professeurs : MM. BACCHUS, Astronomie Calcul Numérique
BECART, Physique
BERKER, Mécanique des Fluides
BLOCH, Psycho-physiologie
BONNEMAN-BEMIA, Chimie et Physico-Chimie industrielles.
BONTE, Géologie appliquée
BOUISSET, Physiologie animale
BOURIQUET, Botanique
CELET, Géologie.
MM. CORSIN, Paléobotanique
DECUYPER, Mathématiques.
DEDEKER, Professeur associé Mathématiques
DEFRETIN, Biologie marine
DEHORS, Physique industrielle
DELATTRE, Géologie

DELEAU, Géologie
DELHAYE, Chimie générale
DESCOMBES, Calcul différentiel et intégral
GABILLARD, Radioélectricité et électronique
GERMAIN, Chimie Générale et Chimie Organique
GLACET, Chimie
GONTIER, Mécanique des Fluides
HEIM DE B ALZAC, Zoologie
HOCQUETTE, Botanique Générale et Appliquée
Mme LEBEGUE, Physique, Amiens.
MM. LEBEGUE, Botanique
LEBRUN, Radioélectricité et Electronique
Mlle LENOBLE, Physique
MM LIEBART, Radioélectricité
LINDER, Botanique
LUCQUIN, Chimie Minérale
MARION, Chimie
Mlle MARQUET, Mathématiques.
MM. MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des Fluides
MAUREL, Chimie
MENESSION, Géologie
MONTREUIL, Chimie Biologie
PARREAU, Mathématiques
PEREZ, Physique Expérimentale
PHAM MAU QUAN, Mécanique rationnelle et expérimentale.
POITOU, Algèbre supérieure Calcul numérique
POUZET, Mathématiques
PROUVOST, Géologie
MM. SAVARD, Chimie Générale
SCHALLER, Zoologie
SCHLLTZ, Physique

Mme SCHWARTZ, Analyse Supérieure
TRIDOT, Chimie
VIVIER, Biologie animale
WATERLOT, Géologie et Minéralogie
WERTHEIMER, Physique.

- Maîtres de Conférences :

MM. BEAUFILS, Chimie générale et organique
BLANCHARD, Chimie de la houille
BOILLET, Physique générale
BOUGH ON, Mathématiques
BUI TRONG LIEU, Mathématiques
CHASTRETTE, Chimie générale
COMBET, Mathématiques
CONSTANT, Physique
DANZE, Géologie
DEVRAINNE, Chimie minérale
Mme DRAN, Chimie de la houille
MM. FOURET, Physique
GAVORET, Physique théorique
HERZ, Mathématiques
HUARD DE LA MARRE, Calcul numérique
LACOMBE, Mathématiques
MAES, Physique
MONTARIOL, Chimie
MORIAMEZ, Physique
MOUVIER, Chimie
NGUYEN PHONG CHAU, Physique
PANET, Physique et électricité industrielles.

RAUZY, Mathématiques
SAASA, Physique
SEGARD, Chimie biologique
TUDO, Chimie minérale
VAZARD, Mathématiques
VAILLANT, Calcul des probabilités
VIDAL, Physique industrielle.

- Conseiller d'Administration Universitaire : M. JARRY

- Attaché Principal : M. FACON

- Attachés d'administration : M. COLIGNON
M. LEROY
M. JANS.

- A ma femme,

en témoignage de mon amour. Je la remercie pour tous les sacrifices qu'elle a acceptés pour me permettre de réaliser ce travail.

- A mes Parents,

avec toute mon affection filiale et ma profonde reconnaissance pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

- A mon Parrain,

avec mon attachement et ma reconnaissance.

A ma grand-mère

A mes enfants

A ma soeur

A mes beaux-parents

A toute ma famille

A tous mes amis,

En gage d'affection.

A mes Juges,

- A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Je vous remercie d'avoir été mon Directeur de Thèse et aujourd'hui de présider mon jury. Votre ardeur au travail a été pour moi un exemple, et votre amical soutien, un précieux encouragement.

- A Monsieur le Professeur J. GERMAIN,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, je vous en suis très reconnaissant.

A mes Juges,

- A Monsieur le Professeur G. BISERTE,

Par vos conseils et votre enseignement, vous m'avez fait profiter de vos grandes connaissances scientifiques et vous avez très largement contribué à la réalisation de ce travail.

Je suis heureux de pouvoir vous exprimer ma profonde reconnaissance et mon respectueux attachement.

- A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS,

Depuis bientôt dix ans que vous m'avez accepté dans votre laboratoire, vous m'avez continuellement dirigé et conseillé. Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce sujet et je me suis efforcé de me montrer digne de votre confiance et de tous ceux qui, dans votre service, ont étudié l'acide phytique.

Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respectueux dévouement.

- A Monsieur le Professeur P. BOULANGER,

Depuis la première année de mes études vous m'avez accepté comme un de vos élèves et à ce titre j'ai toujours bénéficié de votre grande bienveillance. Par votre exemple et votre enseignement vous m'avez fait découvrir la BIOCHIMIE et la RECHERCHE SCIENTIFIQUE. Je vous dois beaucoup et je suis heureux de vous témoigner de ma profonde reconnaissance et de mon respectueux attachement.

- A mon ami, Monsieur le Professeur R. HAVAZ,

A chaque stade du développement de ce travail tu m'as fait profiter de ta grande compétence en matière de glycoprotéines. Tu n'as ménagé ni ton temps, ni ton travail et je ne pourrais jamais m'acquitter de ma dette envers toi. Tu m'as fait partager ta passion pour la recherche biochimique et j'espère pouvoir longtemps encore profiter de notre fructueuse collaboration.

- A mon vieil ami, Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX,

Je te remercie pour ces nombreuses années d'amitié partagée et de notre collaboration.

- A Monsieur le Professeur P. FLEURY,

La paternelle attention que vous m'avez accordée et l'intérêt que vous portez à tous les chercheurs du laboratoire ont été pour moi le meilleur des encouragements.

- A Monsieur le Professeur P. MALANGEAU,

Je vous remercie des nombreux conseils et encouragements que vous m'avez toujours prodigués.

- A Monsieur le Professeur J. OSTEUX,

Je vous suis reconnaissant pour votre enseignement quand vous étiez mon Chef de Travaux pratiques et pour tous vos conseils amicaux.

- A Monsieur le Professeur F. PERCHERON,

en témoignage de ma respectueuse amitié.

- A mes Maîtres dans les Hôpitaux :

- Monsieur le Professeur R. MERVILLE
- Monsieur le Professeur R. BOURDON
- Monsieur le Professeur R.G. DOURIS
- Monsieur le Professeur G. LE MOAN

- A mes confrères les PHARMACIENS DES HOPITAUX DE PARIS.

- A tous mes Internes,

en souvenir du bon travail que nous avons
effectué ensemble et en gage de celui à
venir.

- A mes amis et collaborateurs :
 - du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de LILLE.
 - du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de PARIS.
 - du Laboratoire Central de Chimie Biologique de l'Hopital . BICHAT.

- A tous ceux qui matériellement et moralement ont participé à ce travail de recherche.

J'ai eu le privilège de bénéficier de votre travail d'équipe sans lequel il est maintenant impossible de mener à bien une recherche scientifique. Les services rendus quodidiennement, la mise en commun de nos préoccupations et l'enthousiasme partagé ont été pour moi la plus belle des découvertes et le meilleur des encouragements.

P R E S E N T A T I O N .

=====

Nous avons rédigé ce travail en deux parties distinctes l'une de l'autre.

Dans la Partie Technique, nous regroupons toutes les méthodes que nous utilisons. Les techniques que nous avons mises au point ou que nous avons modifiées sont décrites en détail avec les considérations qui nous ont guidées dans ce travail préliminaire. Pour les autres techniques nous donnons les éléments pratiques nécessaires ainsi que les références de base. Cette partie technique est autonome : numérotage des chapitres, des figures, et des tableaux ainsi que la bibliographie qui figure dans le texte sous la forme d'un nombre précédé d'un T. Les réactifs sont numérotés dans l'ordre de leur apparition dans le texte.

Dans la Partie Expérimentale, nous exposons nos résultats, les interprétations et les discussions qu'ils entraînent. Chaque fois que cela est nécessaire nous indiquons le chapitre de la partie technique où le lecteur peut trouver les indications de technologie qui nous ont permis d'établir nos résultats.

Pour chacune de ces deux parties les références sont numérotées dans l'ordre de leur apparition dans le texte et sont regroupées dans un index alphabétique (feuilles jaunes pages 93 à 99 et 225 à 234). Les figures sont numérotées en chiffres arabes et les tableaux en chiffres romains. Toutes les indications concernant les appareillages et les produits utilisés sont regroupées dans une bibliographie "Matériel" et signalées dans le texte par un M. suivi du nombre de référence.

Les unités sont du système C.G.S. et toutes les températures sont exprimées en degré centigrade.

- P A R T I E T E C H N I Q U E -
=====

I. - CONDITIONS OPERATOIRES POUR LE PRECIPITATION PHYTIQUE.

A. PRINCIPE :

A pH voisin de 2,10, l'acide phytique précipite les protéines. Cette précipitation n'est optimale que dans certaines conditions de pH. de force ionique, et de concentration en acide phytique (voir partie expérimentale : troisième chapitre).

Nous décrivons d'abord une technique de précipitation analytique destinée aux études quantitatives et en particulier à la mesure de l'indice de combinaison phytique des protéines. Après minéralisation du précipité de phytate de protéine, on effectue les dosages de phosphore orthophosphorique et de l'azote ammoniacal (partie technique : chapitre II). Le rapport P/N permet le calcul de l'indice de combinaison phytique (voir partie expérimentale : deuxième chapitre).

Nous donnerons ensuite une technique de précipitation destinée à l'étude qualitative du liquide surnageant et du précipité, ainsi qu'à l'identification et l'isolement des protéines de ces préparations.

B. PRECIPITATION ANALYTIQUE :

1. Réactifs :

R. 1- Réactif précipitant : (solution approximativement 0,007 N en acide phytique et 0,05 M en acide citrique).

- Phytate de sodium (M. 17) 1 g.
- Acide citrique 10,5 g.
- Eau distillée q.s.p 1 l.

Ajuster le pH à 2,10 avec de l'acide chlorhydrique normal. Ce réactif est d'assez mauvaise conservation et il est bon de le renouveler tous les quinze jours.

R. 2- Réactif précipitant privé de sodium :

Pour l'étude de l'influence de la force ionique sur la précipitation phytique nous avons préparé un réactif par dilution d'une solution concentrée d'acide phytique obtenue par passage d'une solution de phytate de sodium sur une colonne d'échangeur de cation.

Faire passer sur une colonne (diamètre: 35 mm, hauteur: 50 cm) de DOWEX 50, X 12 (forme H⁺, 400-600 mesh) une solution de phytate de sodium à 150 g/l. Contrôler le pH de l'effluent de la colonne à l'aide d'un papier indicateur de pH. Recueillir l'éluat dès que celui-ci donne une réaction franchement acide (pH inférieur à 2). Arrêter dès que l'effluent devient alcalin afin de régénérer la colonne.

Il est difficile d'éliminer la totalité du sodium en une seule opération. Il est donc préférable d'effectuer un second passage sur une colonne identique à la première. On détermine le titre de la solution d'acide phytique ainsi obtenue avec un titrateur automatique (M. 38), à l'aide d'une solution normale de soude (voir partie expérimentale : premier chapitre : E).

2. Technique :

Dans un tube à hémolyse pour centrifugation mesurer :

- Réactif précipitant (R. 1) 5 ml
- Solution de protéine (environ 3 mg/ml) 1 ml.

Mélanger par retournement et laisser reposer environ 2 heures à 4°. Lors de certaines expériences nous avons laissé sédimenter le précipité pendant 22 heures à 4°. les résultats sont identiques à ceux obtenus en 2 et en 7 heures.

Centrifuger 10 minutes à 5 000 ou 6 000 tours/minute et transvaser le liquide surnageant dans un tube à essai. Laisser égoutter sur un papier filtre jusqu'au lendemain. En effet, le précipité laisse écouler lentement un peu de liquide qu'il faut mieux éliminer afin d'éviter une cause d'erreur par excès sur le dosage du phosphore phytique. Essuyer soigneusement les parois intérieures des tubes avec un papier filtre enroulé. Boucher en attendant la minéralisation (partie technique : chapitre II C).

Contrôler le pH du liquide surnageant avec un pH mètre muni d'une micro-électrode combinée (M. 30 - M. 32). Ce pH est généralement compris entre 2,10 et 2,40. Vérifier également que le liquide surnageant ne précipite pas par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 200 g/l.

La solution de protéine utilisée comme prise d'essai est préparée avec une solution de chlorure de sodium à 3 g/l, afin d'éviter la précipitation des gamma-globulines. Pour l'étude de protéines isolées ou de mélanges de protéines nous choisissons toujours la force ionique la plus faible compatible avec la mise en solution de la prise d'essai.

C. PRECIPITATION A L'ECHELLE PREPARATIVE :

1. Technique A (dilution au 1/25ème).

Dans un erlen-meyer mesurer :

Eau distillée	1 600 ml.
Phytate de sodium	1,3 g.
Acide chlorhydrique pur	2 ml.

Agiter jusqu'à dissolution complète, ajuster à pH 2,10 avec l'acide chlorhydrique normal.

Dans un autre erlen-meyer mesurer :

Sérum ou plasma humain	100 ml.
Soluté de chlorure de sodium à 9g/l	800 ml.

(Pour l'étude de préparations de protéines en poudre lyophilisée : dissoudre 5 à 7 g. dans 900 ml de solution de chlorure de sodium à 9g/l.)

Mélanger les deux solutions, il se forme immédiatement un précipité abondant. Agiter, contrôler le pH et l'ajuster si nécessaire à 2,10. Laisser reposer environ une heure. Le précipité sédimente en laissant apparaître un liquide surnageant limpide. Si le milieu est trouble ou si le précipité se sédimente mal, il faut chercher une cause d'erreur éventuelle : force ionique trop importante, pH mal ajusté, acide phytique en quantité suffisante.

Centrifuger 15 minutes à 5 000 tours par minute dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°. Pour l'étude du liquide surnageant, il est possible de filtrer la préparation sur un papier plissé SCHLEICHER & SCHULL N° 2 043b (M. 23). Si l'on désire étudier le précipité il est préférable d'opérer par centrifugation.

2. Technique B (dilution au 1/10ème)

Opérer de la même manière avec les proportions suivantes :

- Eau distillée	600 ml.
- Phytate de sodium	1,3 g.
- Sérum ou plasma humain	100 ml.
- Solution de chlorure de sodium à 9 g/l ...	300 ml.

3. Discussion :

La technique A est recommandée pour l'étude du précipité. En effet, avec une dilution au 1/25ème les adsorptions des protéines du liquide surnageant par le précipité sont plus limitées.

Pour l'étude du surnageant nous préférons la technique B. Il se produit très certainement une diminution du rendement par adsorption sur le précipité, mais le volume de liquide surnageant à traiter est beaucoup plus faible. Ceci permet d'opérer plus rapidement et d'améliorer la qualité de l'extrait phytique.

Nous préférons opérer en présence de chlorure de sodium. En effet BISERTE (T. 1) d'une part, et GRABAR (T. 2) d'autre part ont montré que certains sérômucoides sont plus facilement isolés en présence de chlorure de sodium.

4. Préparation de l'extrait phytique a partir du liquide surnageant.

a- Contrôles préalables :

Immédiatement après centrifugation, vérifier sur 1 ml. que le liquide surnageant ne précipite ni par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 20 p. 100, ni par mélange avec 1 ml d'acide phytique environ 0,1 N.

Contrôler le pH qui doit être entre 2,10 et 2,40. Ajouter goutte à goutte de la soude environ 5 N. pour amener la totalité du liquide surnageant à un pH compris entre 5 & 6.

Les glycoprotéines étant instables en milieu alcalin éviter de laisser la solution à un pH supérieur à 7 plus de quelques instants.

b- Concentration, dialyse et lyophilisation du surnageant phytique.

Le grand volume de surnageant phytique doit être réduit considérablement et dialysé avant de pouvoir être lyophilisé dans de bonnes conditions. L'évaporation sous vide à une température inférieure à 40° avec un appareil rotatif (M. 8) fournit la technique la plus pratique. L'ultrafiltration sous 2 à 3 kg de pression par centimètre carré (M. 19 M 20 et M. 21) au travers d'une feuille de cellophane (M. 41) est aussi longue mais évite tout chauffage. Nous avons également pratiqué la concentration par la poudre de Séphadex G 25 (partie technique : IV A). Cette méthode est très élégante mais se révèle fastidieuse lorsqu'elle est utilisée pour des grands volumes.

Enfin la concentration par dialyse contre poudre ou solution concentrée de polymères macromoléculaires (polyvinylpyrrolidone : M 18, ou polyéthylèneglycol : M. 15) est certes plus rapide mais comporte de gros risques de contamination. En effet une partie de ces produits dialyse vers le liquide à concentrer et il est ensuite très difficile de l'éliminer. Les préparations contenant une forte proportion de ces polymères sont inutilisables pour la plupart des études qualitatives, elles peuvent toutefois convenir pour l'immunisation de lapins.

Le surnageant concentré est dialysé contre eau distillée fréquemment renouvelée afin d'éliminer l'acide phytique et les sels minéraux. Il est possible de dialyser contre eau courante mais dans ce cas il se forme à l'intérieur des boudins de cellophane un précipité de phytate de calcium que l'on élimine par centrifugation. Après dialyse on termine au besoin la concentration de façon à obtenir un volume voisin de 25 p. 100 de celui du volume du sérum traité. Ce surnageant est congelé et lyophilisé (M. 40).

5- Etude qualitative du précipité de phytate de protéine :

Immédiatement après la centrifugation du précipité, essuyer soigneusement les parois intérieures du tube à centrifuger avec un papier filtre enroulé. Mettre le précipité en suspension dans un volume minimum de réactif R. 3 et laisser reposer à 4° jusqu'à dissolution complète.

Réactif 3-

- Lessive de soude	20 ml
- Chlorure de sodium	9 g.
- Eau distillée	q.s.p. 1 l.

La solution alcaline de phytate de protéine doit être neutralisée le plus rapidement possible. Ajouter goutte à goutte de l'acide chlorhydrique 0,1 N jusqu'à apparition d'un louche persistant, que l'on redissout avec un minimum de soude 0,1 N. La solution obtenue est, soit traitée immédiatement en fonction des mesures analytiques envisagées, soit dialysée contre une solution de chlorure de sodium à 9 g/l. et lyophilisée.

II. - CONDITIONS OPERATOIRES POUR LES DIFFERENTS DOSAGES
PERMETTANT LE CALCUL DE L'INDICE DE COMBINAISON
PHYTIQUE.

L'exécution de notre expérimentation a nécessité un très grand nombre de dosages et nous avons été amenés à mettre au point les techniques d'analyse automatique que nous allons décrire dans les chapitres qui vont suivre. Dans une première partie nous résumons les principes fondamentaux de cette analyse automatique.

A- PRINCIPES FONDAMENTAUX DE L'ANALYSE AUTOMATIQUE

1. Pompage et déplacement des fluides :

Une pompe constituée par des rouleaux d'acier se déplaçant le long de tuyaux en matière plastique tout en les écrasant contre un plateau, pousse le liquide dans la lumière des tuyaux.

Le volume de liquide ainsi pulsé est fonction du diamètre intérieur des tuyaux. Les parois de ces tubes de polyester sont d'épaisseur identique quelque soit le diamètre de la lumière, si bien que une fois comprimés par le rouleau tous les tubes auront la même épaisseur et subiront la même pression. Un ou plusieurs de ces tubes introduit dans le système la prise d'essai à analyser. Les autres introduisent les

réactifs. Il nous faut insister ici sur un élément fondamental de l'analyse automatique : à aucun moment il n'est mesuré de volume défini.

A chaque déplacement d'un rouleau d'acier de la pompe, la colonne de liquide pulsé dans le système est fonction de nombreux facteurs : diamètre du tuyau en plastique, sa tension, son usure etc... Tout repose sur le fait que pour une période de temps donné les débits de fluides créés par la pompe restent constants et surtout la proportion des débits entre les différents tuyaux placés sous la pompe reste rigoureusement stable. Ceci est toujours réalisé vu la qualité des matériaux utilisés.

2. Nécessité d'entrecouper le flux de liquide par des bulles d'air.

Un certain nombre de tubes de pompage est réservé à l'introduction d'air (ou d'un autre gaz) dans le flux de liquide. Vu le faible diamètre des tuyaux cette phase gazeuse forme des bulles qui entrecoupent régulièrement la phase liquide. Ceci répond à plusieurs exigences.

- a- les bulles de gaz évitent la diffusion d'un échantillon sur l'autre ;
- b- la résistance à l'écoulement provoquée par le frottement du liquide sur les parois des tubes fait que les zones périphériques de liquide se déplacent plus lentement que celles se trouvant à la partie centrale. Il faut donc segmenter le flux de liquide pour éviter des interférences extérieures aux phénomènes que l'on désire enregistrer.

- c- la tension superficielle à l'interphase liquide-gaz assure un lavage des surfaces beaucoup plus efficace qu'une phase liquide continue. Le système est donc continuellement rincé ce qui limite toute souillure d'un échantillon par l'autre.
- d- lorsque l'on mélange deux liquides dans un flux ceux-ci (vu leur différence de densité) tendent à se superposer un certain temps avant de se mélanger. Si ce flux est entrecoupé de bulles de gaz lors d'un passage dans une bobine hélicoïdale à axe horizontal, à chaque tour de spire la couche la plus dense se trouve à la partie supérieure du liquide et le mélange est ainsi très rapide.
- e- enfin un même échantillon se trouve segmenté en de nombreux petits éléments de réaction. Chacun sera traité séparément et à la fin du circuit ils se présenteront successivement devant le dispositif enregistreur, c'est l'intégration de ces nombreuses analyses qui constituera la réponse statistiquement valable de l'appareil.

3. Dialyse.

Cet élément est indispensable pour éliminer les grosses molécules pouvant interférer avec la réaction analytique désirée et remplace la défécation classique dans les techniques manuelles. Cette séparation est réalisée d'une façon élégante par l'introduction dans le circuit d'un plateau de résine acrylique dans lequel a été creusée une gouttière. Une membrane de cellophane assure la fermeture de la gouttière et canalise le flux du liquide. De l'autre côté de cette

membrane, une gouttière exactement symétrique creusée dans un autre plateau de résine acrylique canalise une solution qui se déplace à la même vitesse que la dilution de liquide à doser. Elle reçoit par dialyse les petites molécules et la suite des opérations analytiques s'effectuent sur ce liquide de contre-dialyse. Le dialyseur est placé dans une enceinte à température constante (en général 37°), la vitesse de dialyse étant fonction de la température.

La dialyse n'est nécessaire que dans certains cas particuliers ; nous en fournirons de nombreux exemples dans les descriptions de techniques qui vont suivre.

4. Temps de parcours dans le circuit.

La prise d'essai éventuellement diluée, entrecoupée de bulles d'air, dialysée si nécessaire et additionnée de réactifs parcourt le circuit ; si l'incubation de la réaction nécessite un chauffage on fait passer le flux de liquide dans un serpentin de verre placé dans un bain-marie à température pré-établie (le plus souvent 95°). Si la réaction se développe à la température du laboratoire mais demande un certain temps pour atteindre son optimum il suffit d'allonger le circuit par addition de bobines de verre. Chaque échantillon se déplace donc le long du circuit et le temps du parcours est toujours identique. Même si la réaction chimique n'est pas complètement développée dans le temps de l'incubation correspondant au circuit on peut être certain que cette réaction sera enregistrée toujours au même stade de son développement.

5. Dispositif d'enregistrement.

Le plus souvent le dispositif d'enregistrement est constitué par un photolorimètre bicellulaire-enregistreur muni d'une cuve de lecture à flux continu. Il importe d'éliminer les bulles d'air avant de faire passer le flux de liquide devant le rayon lumineux. Pendant un temps très court la diffusion pourra donc se produire d'un échantillon sur l'autre. C'est ce qui explique que l'enregistrement soit en fait une courbe en cloche au lieu du rectangle théoriquement prévisible.

Selon le principe du montage adopté et selon la nature de la réaction (diffusibilité du colorant par exemple) la réponse de l'enregistrement mettra un temps plus ou moins long à atteindre le plateau qui constitue la réponse (transmission ou densité optique). C'est le facteur qui fixe l'intervalle de temps minimum entre deux prises d'essai successives en analyse automatique et limite la sensibilité de la méthode en analyse en continu.

A plusieurs occasions nous avons enregistré le pH du flux de liquide (voir plus loin). Il est évident que tout autre dispositif électrométrique peut être utilisé (conductimétrie, photomètre de flamme, compteur de radiation etc.)

6. Dispositif de prise d'essai.

a- Analyse automatique :

Les échantillons sont disposés dans des godets en matière plastique que l'on place dans les orifices d'un

disque en aluminium placé sur le distributeur. Ce disque tourne par intermittence et présente successivement chaque échantillon devant un bec mobile supportant un tuyau relié à un tube de pompe.

Avec l'appareil le plus courant on dispose de trois possibilités :

20	prises d'essai	par	heure	(3	minutes	par	cycle).	
40	"	"	"	(1	minute	30	par	cycle).
60	"	"	"	(1	minute	par	cycle).	

Un cycle de prise d'essai se divise en deux temps :

- Pendant deux tiers de la durée du cycle le bec de prélèvement est abaissé et la pompe aspire dans le circuit la solution à doser,

- Pendant un tiers de la durée du cycle le bec de prélèvement est relevé et la pompe aspire de l'air.

Les réactifs sont pompés sans interruption si bien que entre chaque prélèvement il y a passage d'un flux de réactif pendant une minute, 30 secondes ou 20 secondes selon le rythme de mesure choisi. Ceci permet d'une part un retour de l'enregistreur vers la ligne de base et facilite la lecture, d'autre part assure entre chaque prise d'essai un rinçage du circuit et évite la contamination d'un échantillon par l'autre

Pour certaines analyses on peut disposer d'un distributeur grand modèle muni de tubes de 10 ml, et dont on peut régler à volonté le temps de passage de la prise d'essai et la durée totale du cycle de prélèvement (M. 34).

b- Analyse en continu :

Le tuyau de prise d'essai aspire continuellement la solution à doser soit dans un milieu en cours d'évolution (réaction enzymatique, milieu de culture, etc...) soit dans un flux régulier de liquide (circulation sanguine d'un homme ou d'un animal, effluent d'une colonne à chromatographie, liquide à la sortie d'un gradient etc...). Après traitement selon les méthodes habituelles on obtient un enregistrement continu de l'évolution de la composition en un ou plusieurs composés analysés. Dans le cas d'une chromatographie on trace les clochers successifs d'éluion des composés ayant une réaction analytique commune.

Afin d'éviter une trop grande diffusion il importe dans tous les cas de réduire le plus possible le temps mort entre la prise d'essai et le bullage.

Les abcisses du tracé d'enregistrement étant une fonction du temps il importe que le flux de liquide où s'effectue le prélèvement continu soit aussi régulier que possible. C'est pourquoi dans le cas d'une chromatographie, on régularise le débit de la colonne avec une pompe (soit la pompe de l'autoanalyseur soit une pompe à piston du type Minipump (M. 37)).

7. Etalonnage :

On dispose sur le plateau distributeur des solutions étalons. Celles-ci sont traitées d'une manière strictement identique à celle des échantillons à doser. D'ailleurs il est préférable, chaque fois que possible, d'intercaler les

étalons dans la série des dosages ce qui permet un contrôle périodique de la stabilité de l'étalonnage.

Toute la précision de la technique repose sur deux exigences :

- Stabilité absolue des conditions de traitement :
longueur des circuits, température, optique du colorimètre, électronique de l'enregistreur.
- Identité entre la nature des étalons et celle des prélèvements à doser. Nous verrons plus loin qu'il faut, lors de la mise au point d'une méthode, tenir le plus grand compte des éléments susceptibles d'influencer la réaction utilisée (acidité d'un liquide de minéralisation, catalyseur, etc...). Il faudra au besoin faire entrer ces éléments dans la composition des solutions étalons.

CONCLUSION

=====

Dans cette partie technique nous avons utilisé l'analyse automatique à des fins très diverses :

1- Analyse automatique classique, en particulier appliquée au dosage du phosphore orthophosphorique et de l'azote ammoniacal dans les liquides de minéralisation (Chapitres II D et II E).

2- Minéralisation continue (chapitre II F).

3- Etude de la composition d'un liquide à la sortie d'un système de gradient (Chapitre III).

4- Comme manipulateur automatique pour la réalisation de précipitation phytique avec un réactif précipitant dont la composition évolue progressivement (Chapitre III.)



Figure N° 1 - Vue d'ensemble d'un appareil pour analyse automatique

(Autoanalyseur Technicon N. 33)

(Voir légende descriptive de la figure N° 2).



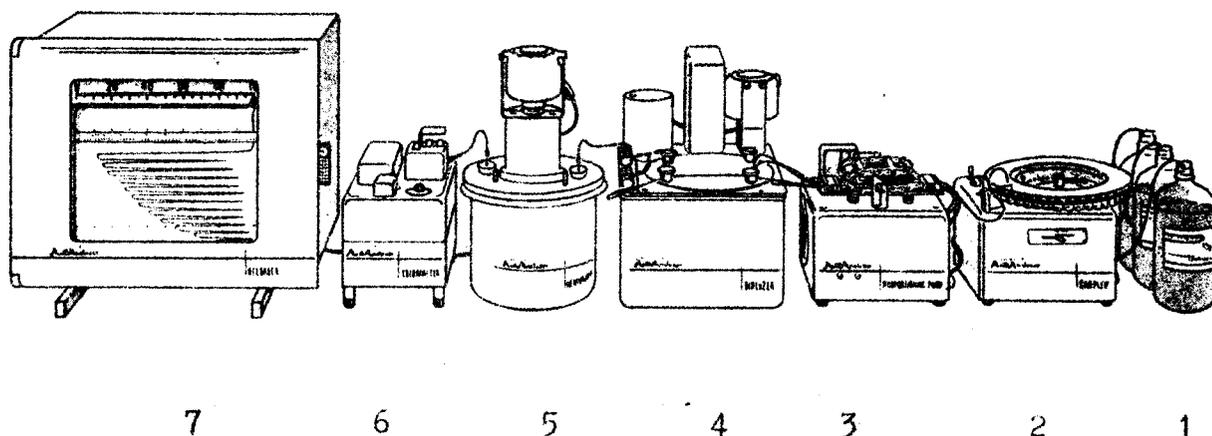


Figure N° 2 : Schéma descriptif d'un appareil pour analyse automatique
(autoanalyseur Technicon M. 33)
Les fluides se déplacent de droite à gauche.

- 1- Réactifs.
- 2- Distributeur d'échantillon.
- 3- Pompe proportionnante.
- 4- Dialyseur à température constante.
- 5- Bain-Marie à température constante.
- 6- Colorimètre.
- 7- Enregistreur.

Tableau I. Code des couleurs pour les tubes de pompe de l'Autoanalyseur TECHNICON (M. 33).
 (Dans toutes les descriptions qui vont suivre nous ne donnerons que les couleurs conventionnelles des tubes de pompe).

Couleur	Diamètre intérieur en mm	Débit approximatif ml par minute.
Orange et noir	0,127	0,015
Orange et rouge	0,190	0,030
Orange et bleu	0,254	0,048
Orange et vert	0,381	0,096
Orange et jaune	0,508	0,159
Orange et blanc	0,635	0,235
Noir	0,76	0,32
Orange	0,89	0,42
Blanc	1,02	0,60
Rouge	1,14	0,80
Jaune	1,42	1,20
Bleu	1,66	1,60
Vert	1,85	2,00
Violet	2,06	2,50
Violet - Noir	2,29	2,90
Violet - Orange	2,54	3,40
Violet - Blanc	2,79	3,90

B- PRINCIPE DE LA MESURE DE L'INDICE DE COMBINAISON PHYTIQUE

Dans la partie expérimentale deuxième chapitre, nous donnons les considérations qui nous amènent à la définition de l'indice de combinaison phytique d'une protéine : c'est le nombre d'équivalents de phosphore phytique combinés à 100 équivalents dans le précipité de phytate de protéine.

La précipitation est effectuée selon la technique que nous venons de décrire au chapitre précédent. Après minéralisation sulfurique et dilution, on dose le phosphore orthophosphorique et l'azote ammoniacal. On peut ainsi établir le rapport phosphore phytique / azote protéique correspondant à un précipité de phytate de protéine. Ce rapport permet de calculer l'indice de combinaison phytique.

Il faut noter que nous dosons le phosphore et l'azote sur le même minéralisat. Les pertes lors de la reprise du précipité et de la dilution du minéralisat n'entraînent aucune erreur sur la détermination du rapport P/N, donc de la mesure de l'indice de combinaison phytique.

C- MINERALISATION

Verser dans le tube à hémolyse contenant le phytate de protéine, 2 ml. de la solution alcaline (R. 3). Laisser reposer une heure à la température du laboratoire. Transvider dans un matras de Kjeldahl, rincer le tube à hémolyse avec 10 ml de réactif de minéralisation (R.4) utilis~~e~~ en plusieurs fois.

Terminer le rinçage avec quelques ml. d'eau distillée.

- R. 4 : Réactif de minéralisation

- Eau distillée 800 ml.
- Sulfate de potassium (R.P.) 20 g.
- Acide sulfurique (MERCK ou R.P.) 100 ml.

Laisser refroidir et compléter à 1 l. avec de l'eau distillée. Ce réactif doit être conservé avec le plus grand soin pour éviter sa contamination par l'ammoniac de l'atmosphère. Certains catalyseurs de minéralisation perturbent le dosage colorimétrique de l'azote. C'est en particulier ^{le cas} de l'ion cuivre (AGNERAY T. 3). Le sulfate de potassium qui élève la température d'ébullition de l'acide sulfurique est suffisant pour assurer une minéralisation rapide et ne gêne aucunement nos mesures. La minéralisation s'effectue selon le protocole habituel : chauffer modérément pour faire évaporer l'eau et ensuite pour maintenir à douce ébullition. Quand le liquide est parfaitement limpide depuis au moins trente minutes, laisser refroidir puis ajouter avec précaution environ 10 ml. d'eau distillée. Transférer dans un tube jaugé à 25 ml. compléter au trait de jauge avec les eaux de rinçage du matras. Boucher soigneusement en attendant le dosage.

D- DOSAGE DU PHOSPHORE ORTHOPHOSPHORIQUE DANS LE MINERALISAT.

La presque totalité de nos dosages de phosphore a été effectuée à l'aide d'un appareil d'analyse automatique (M. 33). Nous reproduisons ci-après la technique que nous utilisons. Toutefois, à l'intention des expérimentateurs ne

possédant pas ce type d'appareil, nous avons publié par ailleurs (COURTOIS T. 4, T. 5, T. 6) une technique manuelle pouvant très bien convenir aux mesures occasionnelles.

1. Principe

En milieu faiblement acide, l'ion phosphorique donne avec le réactif nitrovanado-molybdique de MISSON (T. 7) une coloration jaune dont le maximum d'absorption se trouve au voisinage de 3 600 Å (COURTOIS T. 8 - HENRY T. 9).

2. Réactifs

R. 5- Solution nitrovanadique :

- Vanadate d'ammonium 5,7 g.
- Eau distillée 1 l.

Dissoudre à chaud, laisser refroidir et ajouter avec précaution la solution préparée par ailleurs :

- Eau distillée 660 ml
- Acide nitrique (R.P.) 1340 ml

Le précipité rouge qui se forme d'abord se redissout dans un excès d'acide nitrique.

R. 6- Solution de molybdate d'ammonium :

- Molybdate d'ammonium (R.P.) 100 g.
- Ammoniaque (R.P.) 10 ml.
- Eau distillée q.s.p. 1 l.

Dissoudre à chaud le molybdate d'ammonium dans environ dans 900 ml. d'eau distillée. Laisser refroidir. Ajouter l'ammoniaque et compléter à 1 l. avec de l'eau distillée.

R. 7- Réactif de Misson:

- Solution nitrovanadique (R. 5) 300 ml.
- Solution de molybdate d'ammonium (R. 6).. 200 ml.
- Eau distillée 500 ml.

Les réactifs R.5, R.6, R.7 se conservent parfaitement.

R. 8- Solutions étalons:

Solution mère : 1 mg de phosphore par ml.

- phosphate monopotassique (R.P.) sec 4,387 g.
- Eau distillée q.s.p. 1 l.

Gamme étalon : On prépare la gamme étalon par dilution de la solution mère soit dans l'eau distillée, soit dans une solution d'acide sulfurique, de façon à obtenir une acidité comparable à celle des minéralisats dilués à doser. La conservation est assez bonne en flacons de polyéthylène.

3. Technique:

La figure N° 3 donne le circuit du phosphore ortho-phosphorique avec un appareil pour analyse automatique (M. 33) La prise d'essai est effectuée par le tube N° 1 (vert) et entrecoupée de bulles d'air (tube N° 2:vert). L'extrémité de ces deux tubes est fixée sur une tête de prélèvement à double bec (T). On dilue par de l'eau distillée (tube N° 3 et 4:verts)

et on ajoute le réactif de MISSON (R.7) (tube N° 5 : vert).

La réaction colorée se produit presque immédiatement, il est cependant préférable d'attendre quelques minutes avant de faire la lecture photométrique. Ce délai est obtenu à l'aide d'un serpentín de verre dont le seul rôle est de retarder un peu le passage par la cuve du photomètre. Si l'on ne possède pas de bobine retard, il est très possible d'utiliser le serpentín d'un bain-marie. Entre 10 et 95°, la coloration obtenue est indépendante de la température.

Le photomètre est équipé d'une cuve de lecture de 10 mm. d'un filtre interférentiel de 3 630 Å, et d'un verre de couleur PARRAMANTOIS VUV4 (M. 16).

4. Discussion :

Avec ce dispositif il est possible de doser 0,2 à 20 µg/ml de phosphore orthophosphorique. A 3 630 Å la coloration est assez peu sensible aux variations de pH de la prise d'essai. Il suffit de diluer le minéralisat de façon à obtenir un pH entre 1 et 2. A pH alcalin la réaction est perturbée et les bases fortes décolorent le réactif de MISSON. Les filtres interférentiels donnent une bande passante satisfaisante (± 18 mµ à demi-hauteur) dans la zone de 363 mµ, mais ils laissent le plus souvent passer une faible quantité de lumière verte et rouge. C'est pourquoi il faut adjoindre au dispositif photométrique un verre de couleur qui absorbe ces radiations parasites.

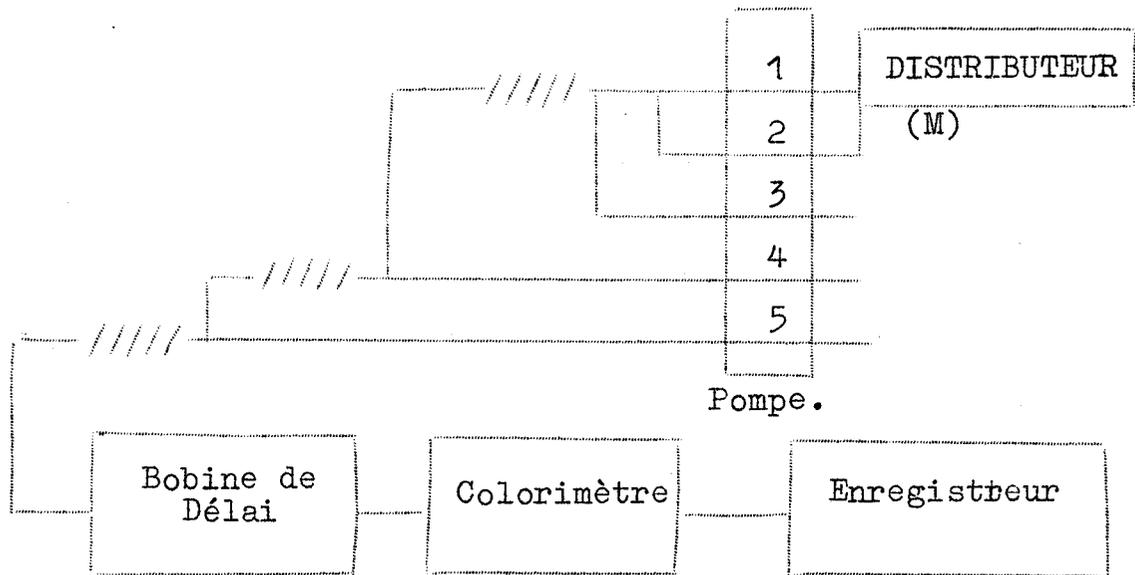


Figure N° 3 : Circuit d'analyse automatique pour le dosage du phosphore orthophosphorique (Chapitre II. D - 3).



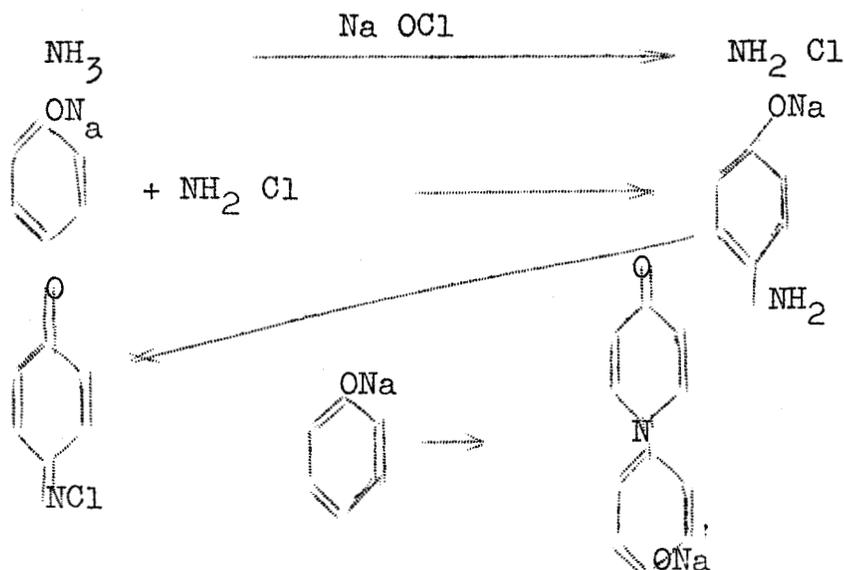
La technique que nous avons mise au point présente quelques avantages par rapport aux techniques initiales. La lecture à 363 m μ au lieu de 420 m μ donne une plus grande sensibilité aux mesures. De plus, à 420 m μ , les variations de pH dans la zone acide entraînent des erreurs. Il faut dans ce cas opérer en milieu tamponné par l'acétate de sodium.

Toutefois à 363 m μ l'absorption du réactif de MISSON est assez importante. C'est pourquoi nous avons utilisé un double bec de prélèvement. Pendant la prise d'essai, le tube N°2 introduit de l'air dans le circuit. Lors de l'intervalle entre deux prises d'essai le tube N° 1 est relevé et aspire de l'air. Pendant ce temps le tube N° 2 se trouve abaissé et plonge dans un récipient à niveau constant contenant de l'eau distillée. Les tube N° 1 et 2 étant identiques, leur débit est équivalent et le réactif de MISSON se trouve toujours dilué dans la même proportion.

E- DOSAGE DE L'AZOTE AMMONIACAL DANS LE MINERALISAT

1. Principe :

On sait depuis BERTHELOT (T. 10) que l'ammoniac en petite quantité dans une solution alcaline de phénol forme avec l'hypochlorite de sodium du bleu d'indophénol. La réaction se déroule en plusieurs stades successifs selon les équations suivantes :



Les variations de pH du milieu entraînent des modifications de la vitesse de développement de la réaction et de l'intensité finale de la coloration. Si le rapport soude/phénol augmente, la coloration se développe plus rapidement mais la densité optique maximale diminue et n'est constante que pendant un temps très court.

Le nitroprussiate de sodium et l'acétone agissent comme catalyseurs, soit isolément, soit en association. Avec l'acétone la réaction se développe très rapidement et la coloration est très stable (plusieurs mois à 4°), (CROWTHER, T. 11) Le nitroprussiate de sodium donne une coloration deux à trois fois plus intense que celle obtenue avec l'acétone mais le développement est beaucoup plus lent (FENTON T 12). L'association de ces deux catalyseurs permet une incubation plus courte avec une sensibilité à peine plus faible que celle obtenue avec le nitroprussiate de sodium. Les tuyaux de polyvinyl qui entrent dans la fabrication des circuits d'analyse automatique se détériorent rapidement en présence d'acétone. Nous préférons finalement utiliser le nitroprussiate de sodium seul.

Nous avons appliqué à l'analyse automatique la technique de BERTHELOT (T. 13), avec les perfectionnements apportés par LUBOCHINSKY et ZALTA (T. 14) et par FLEURY et EBERHARD (T. 15). Nous avons cherché à rendre la technique directement utilisable pour des minéralisats dilués présentant une acidité comprise entre 1 et 2 N. Pour cela, nous préparons tous nos réactifs avec une solution concentrée de phosphate disodique. Une quantité optimale de soude assure l'alcalinisation du milieu. Le pouvoir tampon des réactifs est suffisant pour éviter que les légères différences d'acidité d'un prélèvement à l'autre n'entraînent des erreurs dans les mesures.

Notre technique diffère des autres techniques automatiques (FERRARI, T. 16) par l'utilisation d'un catalyseur. Elle est volontairement moins sensible que la technique de GIRARD (T. 17) et ASSOUS (T. 18) qui est plus spécialement adaptée au dosage de l'ammoniac du sérum humain.

2. Réactifs :

R. 9- Solution de phosphate disodique saturée:

Dissoudre à chaud environ 2 kg. de phosphate disodique dans environ 6 litres d'eau distillée. Laisser reposer une semaine à la température du laboratoire. A partir du deuxième jour, agiter de temps en temps. Filtrer avant usage.

R. 10- Soude diluée :

- Lessive de soude 400 ml
- Eau distilléeq.s.p.: 2 l.

R. 11- Solution tampon :

Mesurer à l'éprouvette :

- Solution saturée de phosphate disodique (R. 9) 4 l.
- Soude diluée (R. 10) 1 l.

Agiter pour mélanger. Ce réactif tend à déposer légèrement il est bon de le préparer quelques jours à l'avance et de filtrer au moment de l'emploi. Il vaut mieux éviter de verser la lessive de soude dans la solution saturée de phosphate disodique. Il se forme un précipité de phosphate trisodique difficile à redissoudre.

R. 12- Solution de phénol :

- Phénol pur 50 g.
- Solution tampon (R. 11) 1 l.
- Eau distillée q.s.p 2 l.

R. 13- Solution d'hypochlorite de sodium 1,5° chlorométrique:

- Solution concentrée d'hypochlorite de sodium q.v
- Solution tampon (R. 11) 1 l.
- Eau distilléeq.s.p 2

R. 14- Solution mère de nitroprussiate de sodium :

Solution à 1 % dans l'eau distillée. La conservation est assez bonne à l'abri de la lumière. Renouveler tous les mois.

R. 15- Solution diluée de nitroprussiate de sodium (1/10 000):

- Solution mère de nitroprussiate de sodium (R. 14) .. 20 ml.
- Solution tampon (R. 11) 1 l.
- Eau distilléeq.s.p. 2 l.

A faire extemporanément.

R. 16- Solution acide :

- Eau distillée 800 ml.
- Acide sulfurique (Merck ou R.P.) 80 ml

Laisser refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Ce réactif doit être conservé en flacon bouché émeri. Il ne doit jamais être ^{dé}bouché plus de quelques instants. Diluer ce réactif au-demi avec de l'eau distillée pour régler le 100 p. 100 de transmission.

R. 17- Solution mère de sulfate d'ammonium (1 mg. d'azote par ml):

- Sulfate d'ammonium (R.P.) sec 4,714 g
- Eau distillée q.s.p. 1 l.

Bonne conservation en flacon bouché émeri.

R. 18- Solutions étalons d'azote ammoniacal (de 1 à 50 µg/ml.)

- Solution mère q.v.
- Solution acide (R. 16) 100 ml.
- Eau distillée q.s.p. 200 ml.

Bonne conservation en flacons de polyéthylène.

3. Technique :

La figure N° 4 donne le circuit pour le dosage automatique de l'azote ammoniacal dans un minéralisat dilué. La prise d'essai (tube N° 1 : noir) est diluée par une solution tampon (R. 11, tubes N° 2, 4 et 5 : violets). Le flux est entrecoupé de bulles d'air (tube N° 3 : violet) privé d'ammoniac par passage sur acide sulfurique (B). On ajoute successivement le phénol alcalin (R. 12, tube N° 6 : violet) l'hypochlorite de sodium (R. 18, tube N° 7 : violet) et le nitroprussiate de sodium (R. 15- tube N° 8 : violet). Après passage dans un bain-marie à 95°, on effectue la lecture photométrique à 625 mµ dans une cuve de 6 mm.

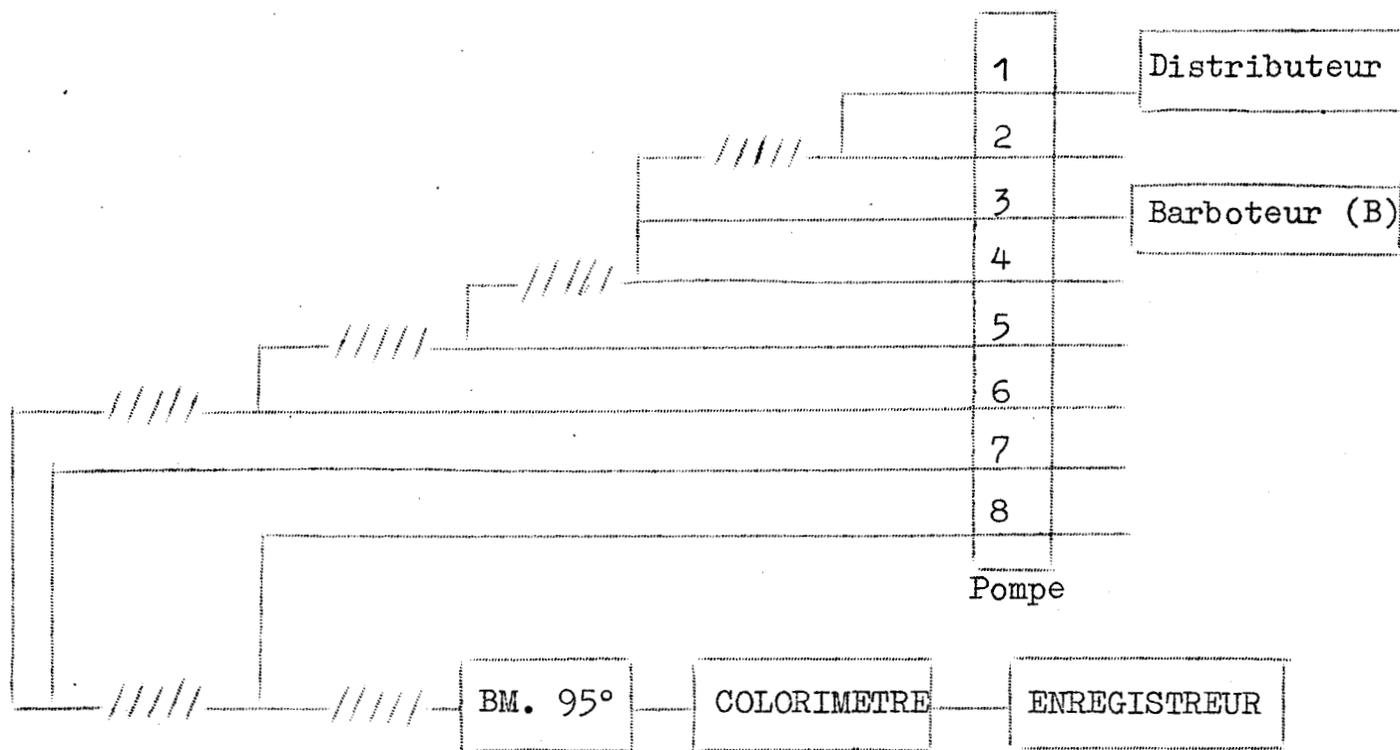


Figure N° 4 : Circuit d'analyse automatique pour le dosage de l'azote ammoniacal (chapitre II E 3).



Cette technique est utilisable de 1 à 30 $\mu\text{g/ml}$ d'azote ammoniacal. Avec un peu moins de précision on peut évaluer les taux entre 30 et 50 $\mu\text{g/ml}$. Il est très facile d'adapter cette technique à des concentrations différentes en modifiant le diamètre des tubes. Il faut dans ce cas faire quelques essais pour vérifier que le pouvoir tampon des réactifs reste suffisant.

4. Discussion :

Lors de la mise au point de cette technique nous avons cherché à incorporer dans les diluants et les réactifs, un système tampon suffisant pour neutraliser l'acidité du minéralisat et surtout pour compenser les légères différences d'acidité d'un échantillon à l'autre. Les meilleurs résultats sont obtenus avec un tampon phosphate disodique-soude (R. 11) Le phosphate disodique à 80 p. 100 de la saturation est insuffisant pour maintenir le milieu à un pH suffisamment alcalin. Les prélèvements les plus acides donnent une erreur très nette par défaut. Cette erreur est moins importante lorsque le tampon comprend 0,1 N de soude. Pour une concentration en soude de 0,2 N dans le réactif R. 11, on obtient des colorations identiques pour une gamme étalon ammoniacal entre les acidités de 0,3 à 2,2 N en acide sulfurique. Au-delà d'une teneur en soude de 0,3 N dans le tampon R. 11, la méthode devient moins sensible. (AGNERAY T. 19).

Nous avons déjà signalé que les ions cuivre apportés par certains catalyseurs (par exemple le mélange de BOIVIN) interfèrent considérablement dans le dosage. La coloration obtenue est fonction inverse de la teneur en cuivre. Cette

inhibition est probablement liée à la formation de complexes cuproamminés. Il est donc préférable d'éviter d'utiliser comme catalyseurs les métaux donnant facilement des complexes, pour notre part, nous utilisons uniquement le sulfate de potassium pour élever la température d'ébullition de l'acide sulfurique.

La presque totalité de nos mesures a été effectuée avec un appareillage d'analyse automatique (M. 33). Toutefois pour les expérimentateurs ne possédant pas ce matériel, nous avons publié une technique manuelle pouvant convenir pour des mesures occasionnelles (COURTOIS T. 20, T. 21)

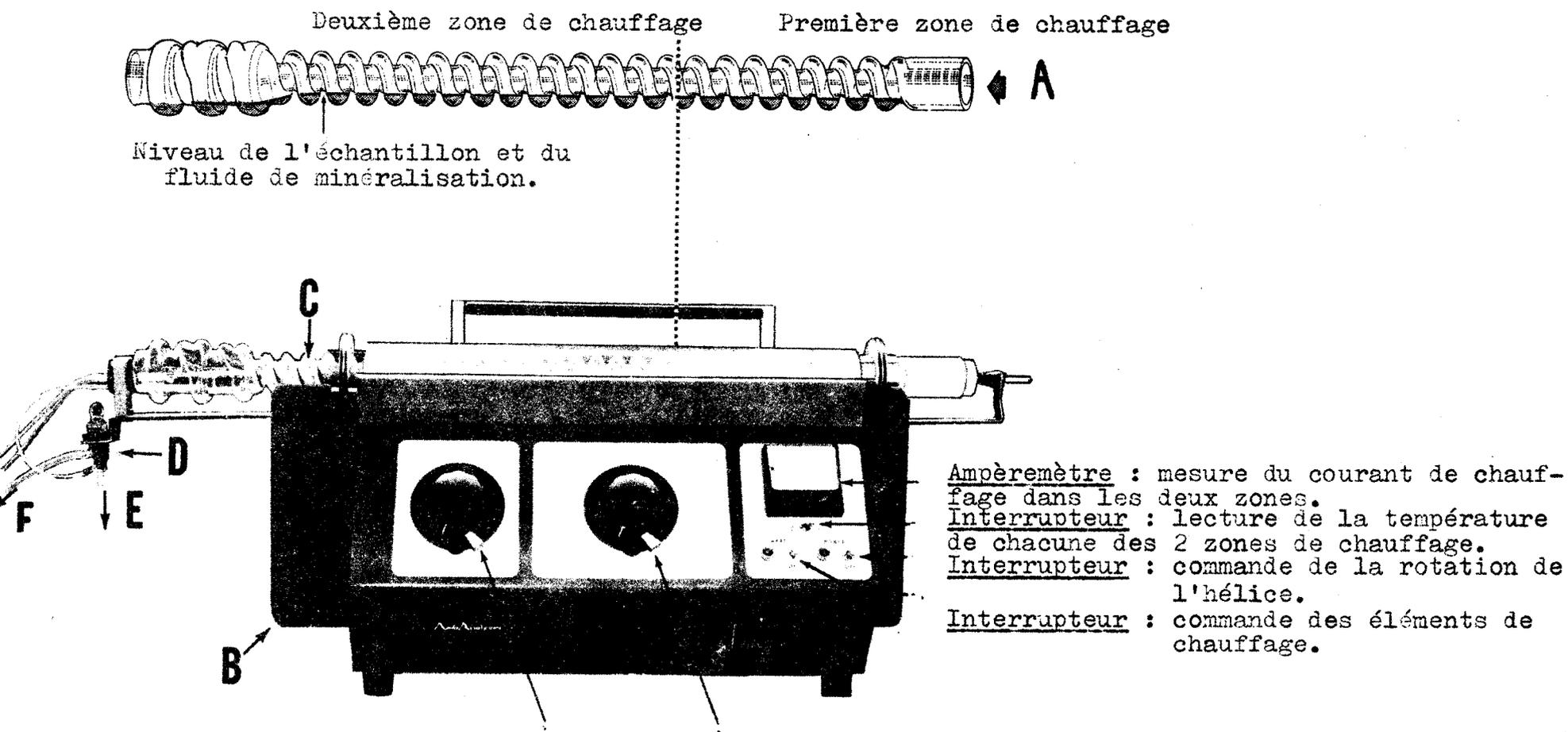
F- MINERALISATION AUTOMATIQUE CONTINUE AVEC DOSAGE SIMULTANE DE L'AZOTE ET DU PHOSPHORE.

La minéralisation automatique continue permet de traiter chaque prélèvement dans des conditions aussi identiques que possible. L'acidité du minéralisat à la sortie de l'appareil est pratiquement constante et on peut, par addition automatique d'une base forte, obtenir un liquide de pH convenable (pH 1 à 2) Sur une partie aliquote de ce liquide on dose simultanément l'azote et le phosphore. Nous avons adapté au minéraliseur automatique continu (M. 35) les techniques automatiques de dosages du phosphore et de l'azote que nous avons décrites dans les chapitres précédents. Pour cette mise au point nous nous sommes inspirés des travaux antérieurs et en particulier de ceux de FERRARI (T. 22) et de WHITEHEAD (T. 23).

L'utilisation du nitroprussiate de sodium comme catalyseur nous a permis de réduire les prises d'essai nécessaires pour la réaction de BERTHELOT. Malheureusement nos préparations de phytate de protéine sont plus riches en azote qu'en phosphore, alors que la technique de dosage de ce dernier est beaucoup moins sensible. C'est pourquoi nous réservons la plus grande partie du minéralisat pour la réaction de MISSON. On remarquera que le volume de la prise d'essai pour ce dosage est très nettement supérieur à celui du réactif utilisé, ce qui est tout à fait inhabituel en analyse automatique. Ceci est possible grâce au prélèvement continu d'une prise d'essai dans un flux de liquide à doser dont tous les éléments sont constants à l'exception de la teneur en ion orthophosphorique. Dans ce cas, il ne se présente plus de difficultés pour réaliser une dilution constante de réactif de MISSON : comme nous l'avons vu dans le cas d'une analyse avec prélèvement intermittent (voir chapitre II D). Il nous est même possible d'utiliser, sans erreur, un réactif nitro-vanado-molybdique (R. 21) plus concentré que le réactif (R. 7).

1. Principe de la minéralisation automatique continue :

Le minéraliseur automatique (M. 35) est essentiellement composé par une hélice en verre Pyrex tournant autour de son axe horizontal au-dessus d'une résistance chauffante (Figure N° 5). Par le côté droit (A) on introduit à l'intérieur de l'hélice le réactif de minéralisation et la prise d'essai à minéraliser. A chaque rotation le liquide qui se trouve dans le pas des spires progresse le long de l'hélice. La forme hélicoïdale présente trois avantages :



Contrôle de la température de chacune des deux zones de chauffage.

- Figure N° 5 : MINERALISEUR CONTINU (M. 35)
 (Voir description p. 35 chapitre II.F. 1)



a- Elle permet le fractionnement du liquide en cours de minéralisation en un certain nombre d'éléments de réaction et évite la diffusion.

b- Elle permet de faire progresser les liquides le long du système et assure un fonctionnement continu.

c- La rotation de l'hélice assure un renouvellement des liquides en contact avec la surface du verre chauffé, ce qui accélère la minéralisation et évite les projections.

Pendant le premier tiers du parcours la résistance chauffante assure une température de l'ordre de 400 à 500° C. Le reste de l'hélice est maintenue entre 300 et 350°. Vers la fin du parcours l'hélice est refroidie par un violent courant d'air (B). On dilue le minéralisat avec de l'eau distillée. Les trois dernières spires (C) sont munies intérieurement d'ergots de verre qui assurent une homogénéisation du liquide qui est aspiré par une pompe à vide dans une chambre de mélange (D). A ce niveau on prélève en continu (E) et on analyse la prise d'essai selon les techniques classiques d'autoanalyse (voir figures N° 5 et N° 6).

2. Réactifs :

R. 19- Réactif de minéralisation :

- Anhydride sélénieux 15 g.
Dissoudre à froid dans 500 ml. d'eau distillée. Ajouter avec précaution et en refroidissant :

- Acide sulfurique (Merck ou R.P) 4500 ml.
Laisser refroidir et ajouter 75 ml. d'acide perchlorique (R.P), agiter et mettre en flacon bouchant émeri.

R. 20- Réactif neutralisant :

- Lessive de soude 3 200 ml.
- Eau distillée 1 800 ml.

Ce réactif doit être ajusté à chaque expérience (voir technique chapitre II F. 3).

R. 21- Réactif de MISSON :

- Solution nitrovanadique (R. 5) 900 ml.
- Solution de molybdate d'ammonium (R. 6) 600 ml.
- Eau distillée 500 ml.

Tous les autres réactifs ont déjà été décrits dans les chapitres précédents.

3. Technique :

La figure N° 6 schématise le circuit de minéralisation automatique que nous utilisons.

Le distributeur d'échantillon effectue 20 prélèvements par heure. Le tube N° 1 (rouge) introduit la prise d'essai. Le tube N° 2 identique au premier entrecoupe ce courant liquide de bulles d'air. Le distributeur est muni d'un double bec de prélèvement : pendant que le tube N° 1 est relevé et aspire de l'air entre deux prises d'essai, le tube N° 2 plonge dans un récipient à niveau constant contenant de l'eau distillée. Pendant l'intervalle entre deux prélèvements c'est donc le tube N° 1 qui introduit l'air dans le circuit et le tube N° 2 fournit un débit d'eau distillée identique à celui qu'aurait apporté la prise d'essai.

Les tubes N° 3 & 4 de deux millimètres de diamètre intérieur sont en "AcidFlex" (élastomère résistant aux acides concentrés) ; ils assurent une alimentation de l'appareil en réactif de minéralisation (R. 19). Toutes les jonctions de ce montage sont effectuées avec des manchons d'Acidflex et des raccords de Téflon. Les fluides pompés par les tubes N° 1 à 4 sont introduits à l'intérieur de l'hélice par un tube Pyrex coudé vers le bas à son extrémité.

Les tubes N° 5 et 6 (violet et blanc) diluent le minéralisat à la sortie de l'hélice avec de l'eau distillée (C). Une pompe à vide (F) aspire la totalité de cette dilution au travers d'une chambre de mélange (D). Le tube N° 7 (violet et orange) assure une prise d'essai continue à la partie inférieure (E) de cette chambre (D). L'excès de liquide est entraîné par la pompe à vide dans un flacon de 5 litres. Un deuxième flacon sert de sécurité pour retenir l'excès de liquide lorsque le premier est plein. Dans un troisième flacon l'air barbote dans une solution de soude à 20 % afin d'absorber les vapeurs d'acide. Un quatrième flacon sert de piège pour retenir les gouttelettes de liquide avant de laisser l'air pénétrer dans la pompe à vide.

Le prélèvement du tube N° 7 est entrecoupé d'air privé d'ammoniac par passage sur acido sulfurique (barboteur G) (tube N° 8 : vert). On neutralise par de la soude diluée (R. 20) (tube N° 9 : violet et blanc). Il faut à chaque mise en route de l'appareil ajuster ce réactif de façon à obtenir après mélange avec la prise d'essai un pH compris entre 1 et 2. Ceci se fait pratiquement en cours de fonctionnement en contrôlant le pH au niveau du trop plein (H.)

Le mélange du minéralisat avec la soude provoque un échauffement important. Les montages à ce niveau sont effectués avec des manchons de Tygon très épais et très serrés. Une bobine mélangeuse de grande taille assure le mélange et une réfrigération suffisante. Il est préférable de ne pas utiliser de bobines réfrigérées par une jaquette d'eau courante. Celles ci sont trop efficaces et le sulfate de sodium produit tend à cristalliser dans le circuit.

En (I) on prélève un aliquot qui, par les tubes N° 10 et 11 (violets) sert au dosage du phosphore. Le prélèvement est entrecoupé par de l'air (tube N° 12 : jaune) et mélangé avec le réactif de MISSON (R. 21) (Tube N° 13 : jaune) Après mélange et passage par une bobine retard, on effectue une lecture colorimétrique dans une cuve de 10 mm avec un filtre 363 m μ protégé par un verre de couleur PARAMANTOIS VUV 4 (M 16) (Voir chapitre II D).

En (J) on effectue une deuxième prise d'essai continue par le tube N° 14 (rouge) afin de doser l'azote ammoniacal. Les tubes N° 15 à 18 (tous violets) introduisent successivement de l'air privé d'ammoniac par passage sur acide sulfurique (barboteur G), la solution alcaline de phénol (R. 12), la solution d'hypochlorite de sodium (R. 13) et la solution de nitroprussiate de sodium (R. 15). Après passage dans un bain-marie à 95°, on effectue la lecture colorimétrique à 625 m μ . dans une cuve de 6 mm. (voir chapitre II E).

4- Considérations pratiques pour le fonctionnement :

a- On attend que tous les courants de liquides circulent régulièrement dans tous les circuits avant d'allumer le chauffage du minéraliseur.

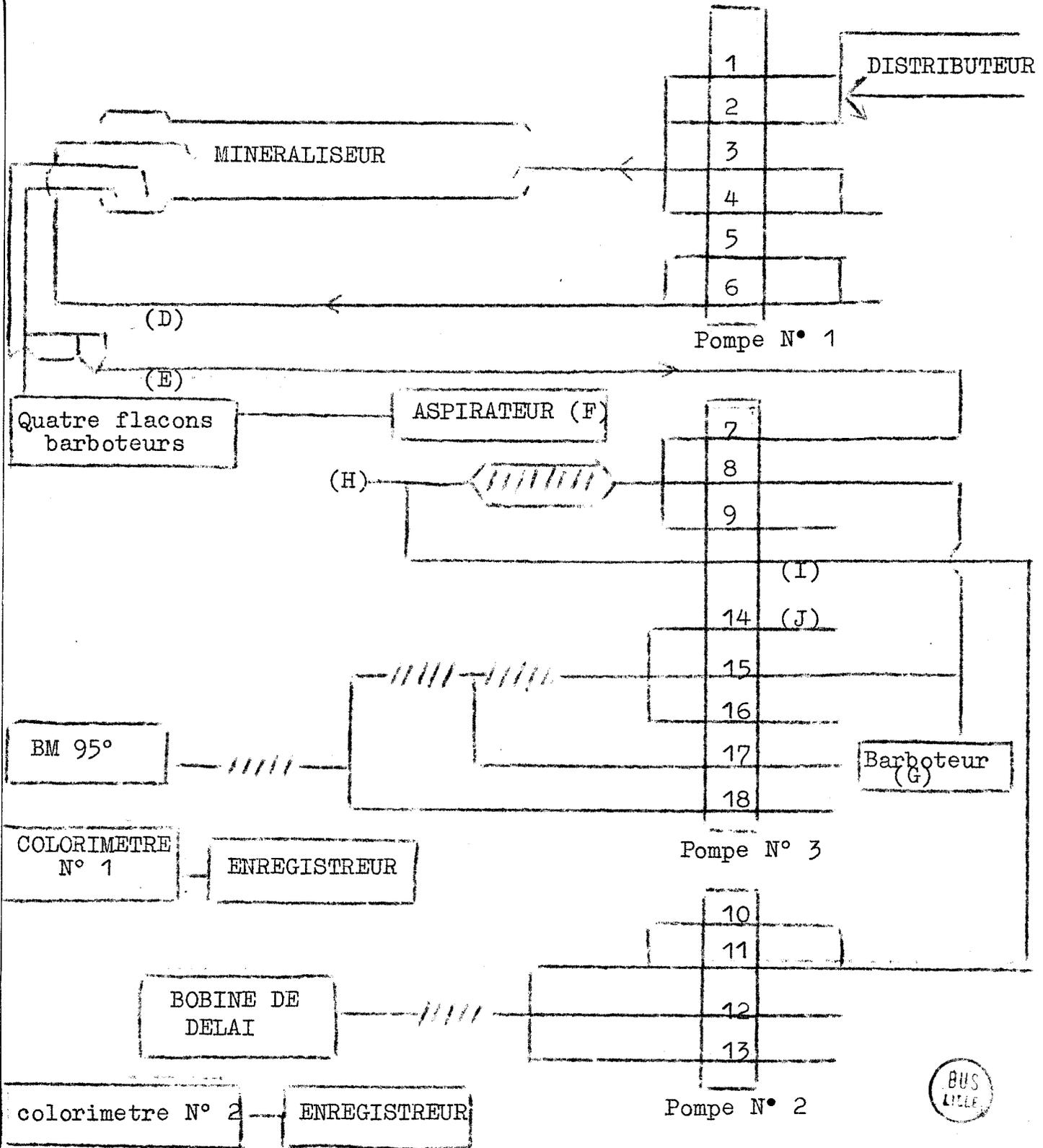


Figure N°6 : Circuit d'analyse automatique pour la minéralisation du phytate de protéine avec dosage simultané de l'azote ammoniacal et du phosphore orthophosphorique (chapitre II)

Ceci est particulièrement important pour le réactif de minéralisation (R. 19) pour le diluant à la sortie de l'hélice et la soude diluée (R. 20). De même, on n'arrête la rotation de l'hélice qu'après refroidissement complet.

b- Pour des raisons d'équipement nous avons conservé le rythme d'analyse à 20 mesures par heure. Les résultats seraient meilleures à 15, voir même 10 prélèvements par heure. Ceci n'est actuellement possible qu'avec un distributeur grand modèle. (M 34) Avec nos conditions de travail il n'est pas nécessaire d'alterner sur le distributeur les godets de solution à doser avec des godets d'eau distillée.

c- L'étalonnage est réalisé avec des solutions contenant à la fois le phosphate monopotassique (R. 8) et le sulfate d'ammonium (R. 18). Nous choisissons pour chaque solution étalon un rapport pondéral P/N égal à 0,2. La technique que nous venons de décrire est utilisable de 5 à 100 $\mu\text{g/ml}$ de phosphore orthophosphorique et de 25 à 500 μg d'azote ammoniacal.

d- Notre réactif de minéralisation contient un peu moins d'acide perchlorique que dans la formule classique (FERRARI T. 24). En effet, vu la nature de nos solutions à doser, une plus grande quantité d'acide perchlorique ne s'est pas révélée nécessaire. Pour des prises d'essais plus importantes et surtout celles contenant des lipides il faut utiliser de préférence le réactif décrit par FERRARI.

e- Avec cette technique de minéralisation automatique continue les étalons sont effectivement minéralisés comme les solutions à doser. Dans ce cas les cations utilisés comme catalyseurs, ne peuvent en aucun cas être à l'origine d'erreurs de mesure. On peut donc les utiliser s'ils ne sont pas à l'origine d'une baisse

trop importante de la sensibilité. Nous avons conservé l'oxyde de sélénium qui entre dans la composition du réactif de minéralisation. Cette dernière est beaucoup plus rapidement terminée : en moins de cinq minutes ce qui est indispensable avec ce matériel.

III. - DISPOSITIF AUTOMATIQUE POUR L'ETUDE DE L'INFLUENCE
DE DIVERS PARAMETRES SUR LA PRECIPITATION PHYTIQUE.

A- PRINCIPE :

Quatre récipients communiquant entre eux, réalisent un système de gradient analogue à celui décrit par PETERSON et SOBER (T. 25 et T. 26) (M. 36) pour l'élution des chromatographies sur colonne. A la sortie de ce dispositif on obtient un réactif dont la composition en l'un des éléments est progressivement variable. Cette variation est enregistrée après analyse en continu sur une partie aliquote. On mélange une autre partie du réactif avec une solution de protéine et on recueille la suspension de phytate de protéine avec un collecteur (M. 34), M. 14) par fractions de 6 ml. La mesure de l'indice de combinaison phytique sur chacun des tubes permet de mettre en évidence l'influence du paramètre variable du réactif précipitant sur la précipitation phytique de la protéine étudiée.

B- TECHNIQUE

1- Description du circuit :

La figure N° 7 schématise le montage utilisé. Les récipients A et B sont d'un volume constant de 100 ml. Les cylindres C et D sont des vases communicants dont le volume du contenu varie pendant l'expérience.

Dans ces quatre récipients on place des réactifs précipitants (analogues aux réactifs 1 ou 2 du chapitre I. B) Ceux-ci sont identiques en tout point sauf en ce qui concerne l'élément dont on désire étudier l'influence sur la précipitation phytique. Par trois tubes N° 1 - 2 et 3 (violet et orange) on prélève environ 10,2 ml/minute de réactif dans le récipient A. Celui-ci étant hermétiquement bouché, ce prélèvement est remplacé par un volume identique provenant du récipient B. Il se produit le même déplacement de liquide entre C et B. Entre C et D c'est le principe des vases communicants qui assurent le passage du réactif d'un récipient à l'autre. Des agitateurs magnétiques homogénéisent constamment le contenu des récipients. Il se crée ainsi une variation progressive de la composition du réactif précipitant.

La solution provenant de la pompe passe dans une cellule hermétiquement close (E) munie d'une tubulure d'entrée à la partie inférieure et une sortie à la partie supérieure. Une électrode combinée (M 32) est fixée par l'intermédiaire de son rodage. On peut ainsi à tout moment contrôler le pH avec un compensateur (M. 30), lorsque le pH est le paramètre à étudier, on enregistre celui-ci avec un pH-mètre enregistreur (M. 38).

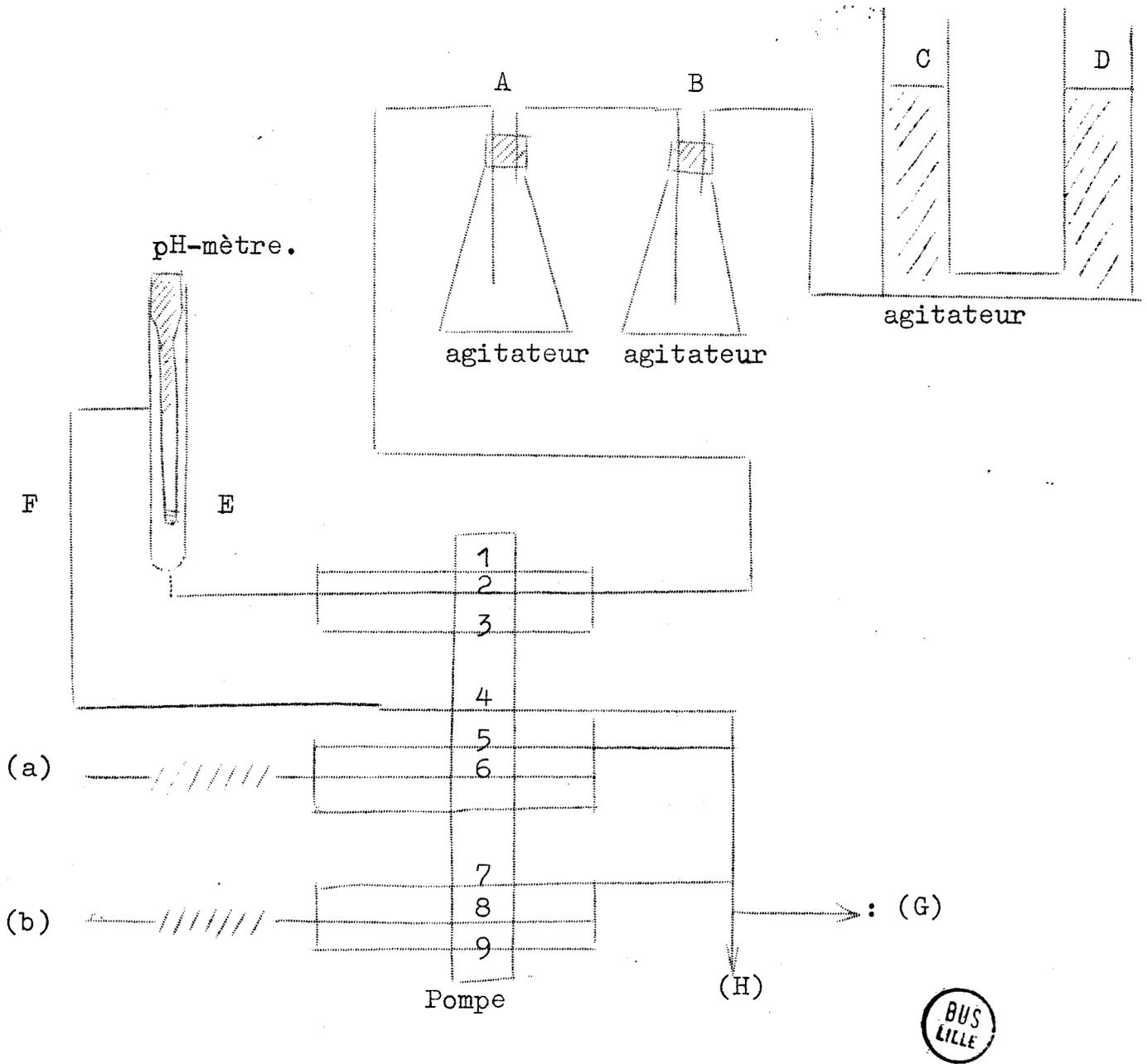


Figure N° 7 : Dispositif automatique pour l'étude de l'influence de divers paramètres sur la précipitation phytique (voir chapitre III. B)

A la sortie de la cellule on prélève un aliquot de réactif alimentant deux circuits (a et b). Le tube N° 4 (violet et blanc) introduit dans le circuit (a) le réactif précipitant. Le tube N° 5 (jaune) entrecoupe de bulles d'air et le tube N° 6 (rouge) apporte la solution de protéines à précipiter. Après mélange la suspension est recueillie dans un tube à hémolyse pour centrifugation, par fractions d'environ 6 ml, soit manuellement, soit de préférence à l'aide d'un collecteur de fractions (M. 14, M. 34) le circuit (b) est identique et permet d'étudier en parallèle une autre solution de protéine.

Après deux heures de repos, les tubes sont centrifugés et traités comme nous l'avons décrit au chapitre II.

En (G) un autre tube permet le prélèvement continu d'un aliquot de réactif afin de doser automatiquement l'élément variable (acide phytique, acide citrique, ions chlore). L'excès de réactif non utilisé est éliminé en (H).

2- Considérations pratiques pour le fonctionnement :

- a- Il n'est pas nécessaire de régler très exactement les caractéristiques du gradient car c'est l'enregistrement des variations obtenues qui sert de référence pour l'interprétation.
- b- Ce dispositif permet de comparer l'influence du paramètre étudié sur deux protéines différentes, dans des conditions absolument identiques. Ceci n'aurait pu être réalisé par d'autres moyens. C'est ainsi que nous avons comparé dans toutes les expériences la sérum-albumine humaine (M. 22) et les gammaglobulines placentaires (M.9). On enregistre de façon évidente leurs différences de réactivité.

c- Il est inutile d'entrecouper de bulles d'air le circuit (1, 2, 3). Les débits de liquides sont très importants et les risques de diffusion à peu près nuls.

d- La pompe est munie d'un bloc de fixation à 15 places : les tubes N° 5, 6, 7, 8 et 9 sont placés sur la rangée inférieure, les autres plus gros et mécaniquement plus résistants sont fixés sur la rangée supérieure.

e- Le seul problème délicat consiste à synchroniser l'enregistrement des variations du paramètre étudié et le numérotage des tubes sur le collecteur de fraction. Ceci est réalisé en introduisant à la sortie de la cellule (E) une solution de colorant (vert de Lissamine, ou Noir Amido '2 BN). Le clocher obtenu sur l'enregistrement correspond au tube coloré. Cette synchronisation est effectuée avant et à la fin de chaque expérience en prévoyant un temps de rinçage suffisant pour l'élimination totale du colorant.

Après chaque série le circuit est lavé avec de la soude environ normale puis rincé à l'eau distillée jusqu'à neutralité des liquides à la sortie.

f- Pour chaque expérience le nombre de mesures d'indice de combinaison phytique (nombre de tubes dans le collecteur) est fonction du volume de réactif dans les récipients C et D. Par exemple avec 400 ml dans chacun de ces cylindres, on obtient environ 60 mesures pour chacune des deux séries. La forme du gradient est fixée par le rapport des compositions des réactifs dans chacun des éléments du gradient. On le choisit en fonction d'expériences préliminaires.

g- Nous enregistrons la concentration en l'élément variable du réactif avant mélange avec la solution de protéines étudiées. Pour obtenir la concentration dans le milieu de précipitation, il faut connaître le rapport des débits des tubes N° 4 et 6 d'une part et des tubes N° 7 et 9 d'autre part. Ces débits pouvant varier nous préférons établir périodiquement le coefficient de transformation de la concentration dans le réactif en la concentration dans le milieu final, par mesure de la densité optique d'une solution colorée avant et après dilution. Par exemple le réactif est remplacé par une solution de Noir Amido 12 BN et la solution de protéine par de l'eau distillée. La lecture photolorimétrique est effectuée à 625 m μ . Dans de bonnes conditions le coefficient de transformation est voisin de 0,82.

C- ENREGISTREMENT DES PARAMETRES VARIABLES.

1. Variations du pH :

Nous opérons avec des gradients très doux : les écarts maxima entre les pH des récipients A et D sont toujours inférieurs.

2. Variation de la concentration en acide citrique :

a- Principe.

Un aliquot continu de réactif précipitant prélevé à la sortie du gradient (figure N° 7 : G) est dilué par de l'eau distillée. Une partie de cette dilution est chauffée en présence de permanganate de potassium en milieu sulfurique. Dans certaines limites de concentration, la décoloration est fonction de la teneur en acide citrique.

b- Réactif :

R. 22 - Solution extemporanée de permanganate de potassium à 1 / 1000 dans l'acide sulfurique environ 0,6 N. Ce réactif est ajusté de façon à obtenir une ligne de base voisine de 20 % de transmission.

c- Technique :

La figure N° 8 résume le montage nécessaire au dosage continu de l'acide citrique dans le réactif précipitant. Le tube N° 1 (noir) introduit dans le circuit la prise d'essai, les tubes N° 2 (violet) et N° 3 (violet et blanc) diluent avec de l'eau distillée. Le tube N° 4 (vert) entrecoupe de bulles d'air. Après mélange on prélève en (I) une prise d'essai (tube N° 5 : noir). Le "T" de prélèvement (I) est disposé de telle manière que, toutes les bulles d'air se trouvent éliminées avec l'excès de dilution par le trop plein (J). La prise d'essai est successivement mélangée avec la solution de permanganate de potassium (R. 22) (tube N° 6 : violet) et avec l'acide sulfurique environ 0,6 N (tube N° 7 : violet et blanc). On entrecoupe de bulles d'air (tube N° 8 : vert), on mélange et on passe par un bain-marie à 95°. La lecture photocolormétrique est effectuée à 553 m μ avec une cuve de lecture de 6 mm.

On étalonne avec des solutions d'acide citrique de titre connu. Dans les conditions que nous venons de décrire, une solution d'acide citrique 0,15 M donne 95 % de transmission, c'est-à-dire une décoloration pratiquement totale. On obtient de bons enregistrements pour des concentrations en acide citrique entre 0,1 et 0,15 M.

Cette technique n'est utilisable qu'en l'absence de composés pouvant réagir avec le permanganate de potassium. Dans notre cas particulier nous avons vérifié que l'acide phytique et les faibles concentrations d'ion chlore ne provoquent aucune erreur. Chaque expérience est effectuée de la concentration 0 (gradient A) : à 0,1 ou 0,2 M (gradient D), en une seule opération.

3- Variations de la concentration en acide phytique :

a- Technique :

Pour une partie de nos travaux, nous avons dosé directement le phosphore de l'acide phytique après minéralisation continue avec le circuit décrit au chapitre II. F.) Dans les cas où les concentrations en acide phytique sont trop élevées on y adjoint un petit circuit de dilution de la prise d'essai, analogue à celui des tubes N° 1, 2, 3 et 4 de la figure N° 8.

b- Détermination de ces variations par le calcul :

A plusieurs reprises il nous a été impossible de disposer du matériel nécessaire à la minéralisation au moment où nous effectuions nos expériences de précipitation. Dans ces cas il nous a quand même été possible d'obtenir les résultats qui nous étaient nécessaires grâce aux considérations analytiques suivantes :

Utilisant un matériel d'autoanalyse, nous ne mesurons à aucun moment de volume précis (Voir chapitre II. A, 1). Par contre les débits sont constants et les différents réactifs sont toujours mélangés dans les mêmes proportions.

Soit b la concentration en azote ($\mu\text{g/ml}$) de la solution de protéine.

Soit a la concentration en phosphore phytique ($\mu\text{g/ml}$) du réactif précipitant. Cette concentration varie d'un tube à l'autre.

Soit n le volume de solution de protéine se trouvant dans un tube du collecteur.

K_n est le volume de réactif précipitant pour ce tube.

K est une constante. Elle ne dépend que des débits des tubes de pompe (tubes N° 4 et 6 d'une part, et tubes N° 7 et 9 d'autre part) (voir figure N° 7).

On peut admettre que le volume du précipité est négligeable. On peut donc écrire.

$$\begin{aligned} \text{Volume total d'un tube} &= \text{volume du liquide surnageant} \\ &= n (K + I) \end{aligned}$$

Soit x la concentration en azote du liquide surnageant ($\mu\text{g/ml}$).

Soit y la concentration en phosphore phytique du liquide surnageant ($\mu\text{g/ml}$).

Nous avons vu chapitre II. B que pour la mesure de l'indice de combinaison phytique, le précipité est repris par 2 ml de réactif (R. 3).

Soit N la concentration en azote ($\mu\text{g/ml}$) dans le liquide de reprise.

Soit P la concentration en phosphore phytique ($\mu\text{g/ml}$) du liquide de reprise.

On peut écrire :

$$\begin{aligned} \text{(I) Phosphore total} &= \text{Phosphore du} &+ & \text{Phosphore du} \\ \text{d'un tube} & \text{liquide surnageant} & & \text{précipité.} \\ &= \text{Phosphore du réactif précipitant.} \end{aligned}$$

C'est-à-dire :

$$Kna = Y n (K + 1) + 2 P$$

De même :

$$(2) \quad \begin{array}{l} \text{Azote total} \\ \text{d'un tube} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Azote du liquide} \\ \text{surnageant.} \end{array} + \begin{array}{l} \text{Azote du} \\ \text{précipité.} \end{array}$$

$$= \text{Azote de la prise d'essai}$$

C'est-à-dire :

$$n b = n (K + 1) x + 2 N$$

De (1) on tire une valeur de n que l'on reporte en (2) et on obtient la formule générale :

$$a = \frac{I}{K} \left\{ \frac{P \cdot b}{N} + (y - x) (K + 1) \right\}$$

K est une constante. Nous avons déjà donné au chapitre III B 2 g une méthode pour la déterminer.

P et N sont toujours dosés pour la détermination de l'indice de combinaison phytique.

x et y sont facilement dosables.

Nous pouvons donc calculer la concentration (a) en phosphore phytique pour le réactif précipitant ayant été utilisé pour chacun des tubes du collecteur.

- Si la précipitation des protéines est totale, ce qui se trouve pour la majorité des tubes d'une série : $x = 0$.

La formule générale devient :

$$a = \frac{I}{K} \left\{ \frac{P \cdot b}{N} + (y) (K + 1) \right\}$$

- Si $b = 0$, c'est-à-dire quand il n'y a pas de protéines dans la prise d'essai, la formule générale de vient :

$$a = \frac{y (K + 1)}{K}$$

D'où on déduit :

$$K = \frac{y}{a - y}$$

Cette dernière équation donne un autre moyen d'obtenir la valeur de K pour chacun des circuits de précipitation.

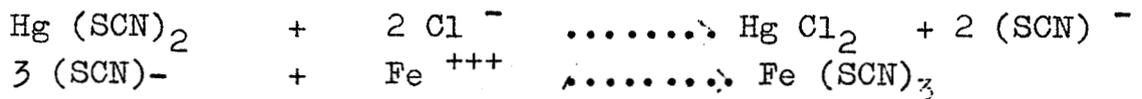
4- Variations de la teneur en ions chlore.

a- Principe :

La force ionique en cations monovalents dont nous étudions par ailleurs l'influence sur la précipitation phytique, est assurée par les chlorures de ces cations. Il nous a semblé plus logique de doser l'ion chlore par une technique commune à tous les cations, ^{plutôt} que de déterminer la concentration de chaque cation par une technique particulière.

Nous avons adapté les techniques de SKEGGS (T. 27) d'une part et ZALL (T. 28) d'autre part, au dosage de l'ion chlore dans le réactif précipitant.

En présence de thiocyanate de mercure l'ion chlore déplace l'ion thiocyanique pour former le complexe $Hg Cl_2$ soluble mais non ionisé. L'ion thiocyanique libéré réagit en milieu acide avec le fer ferrique pour donner une coloration rouge violacée de thiocyanate ferrique (maximum d'absorption voisin de 480 μ .) Cette coloration est fonction de la concentration en ion chlore.



Pour ajuster la sensibilité de la réaction aux concentrations désirées, on ajoute au milieu une certaine quantité de nitrate mercurique. Celui-ci plus averse d'ion chlore que le thiocyanate de mercure réagit le premier et la coloration ne se produira que pour des concentrations plus élevées.

b- Réactifs :

R. 23- Solution saturée de thiocyanate de mercure :

Dissoudre à chaud environ 20 grammes de thiocyanate de mercure dans environ 5 litres d'eau distillée. Laisser reposer 24 heures et filtrer.

R. 24- Solution de nitrate ferrique :

- Nitrate ferrique (R.P)	202 g.
- Acide nitrique (R.P)	50 ml.
- Eau distillée	q.s.p. 1000ml.

R. 25- Solution de nitrate mercurique :

- Nitrate mercurique (R.P.)	6,5 g.
- Acide nitrique (R.P)	2 ml.
- Eau distillée	q.s.p 1000 ml.

R. 26- Réactif d'usage :

- Solution de thiocyanate de mercure (R. 23)...	900 ml.
- Solution de nitrate ferrique (R. 24)	100 ml.
- Solution de nitrate mercurique (R. 26) q.s.p	sensibilité désirée.

Il est préférable de refaire souvent ce réactif à partir des solutions mères, qui elles, se conservent parfaitement.

Avant chaque série, ajuster ce réactif par addition progressive de solution de nitrate mercurique (R. 26). Nous obtenons ce réglage de sensibilité avec un volume de l'ordre de $1 \text{ ml.} \pm 0,5 \text{ ml.}$

c- Technique :

Pour des raisons pratiques nous avons mis au point cette technique de façon à utiliser le même circuit que celui qui nous a servi pour le dosage de l'acide citrique (figure N° 8). Le fonctionnement en est identique si ce n'est que les tubes N° 6 et 7 introduisent le réactif d'usage (R. 26). Le passage par le bain-marie à 95° est inutile. La lecture s'effectue à $480 \text{ m}\mu$ avec une cuve de 6 mm.

IV. - CHROMATOGRAPHIE DES PROTEINES

A. CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE DEXTRANS

1- Principe :

Le dextrane traité par l'épichlorhydrine en milieu alcalin, donne la formation d'un système réticulé qui présente les propriétés d'un tamis moléculaire (FOLDIN T. 29). Cette substance (Sephadex : M. 24) en milieu aqueux prend l'aspect d'un gel. Selon la taille des mailles formées par les ponts glycéryls certaines molécules peuvent pénétrer à l'intérieur des billes de Sephadex alors que d'autres, de volume plus important, restent dans le liquide environnant. On peut ainsi effectuer un véritable tamisage moléculaire.

La poudre de Séphadex, mise en contact avec l'eau, gonfle dans la mesure où l'eau pénètre à l'intérieur des mailles. Ce gonflement est fonction inverse du nombre de ponts glycéryle. En effet une réticulation très importante s'oppose à la dilatation des grains de Séphadex. A la limite un dextrane peu polymérisé donne une pseudosolution. On définit donc la réticulation du Séphadex par le poids d'eau utilisé pour obtenir le gonflement maximum de dix grammes de poudre sèche. Un Séphadex G. 25 (25 g. d'eau pour 10 g. de poudre sèche) est très finement réticulé alors que les mailles du Séphadex G 200 seront beaucoup plus lâches. On dispose commercialement de Séphadex G 25, G 50 G 75, G 100 et G 200.

Lorsque l'on met une poudre sèche de Séphadex G 25 dans une solution de protéine, l'eau et les électrolytes de faible poids moléculaire pénètrent à l'intérieur des grains qui gonflent, Les protéines ayant un poids moléculaire plus important, restent dans la solution. En séparant le Séphadex par centrifugation ou par filtration, on obtient un liquide plus concentré en protéines, mais ayant conservé une concentration en électrolyte identique à celle de la solution initiale.

En chromatographie, le Séphadex permet de créer deux phases (ou zones de diffusion). La première est représentée par la solution à l'intérieur des mailles de chaque grain du support et ne peut contenir que des molécules dont le volume est inférieur à la taille des mailles. La seconde phase est constituée par le liquide interstitiel entre les grains du support, où l'on trouve en plus des électrolytes de faible poids moléculaire la totalité des constituants macro-moléculaires. On réalise ainsi un nouveau type de chromatographie de partage dans laquelle

la répartition des composés entre les deux phases n'est plus fonction de la solubilité (comme c'est le cas pour la chromatographie sur papier), mais dépend uniquement de l'espace de diffusion des molécules à séparer.

Avec une colonne de Séphadex G 25 de dimension suffisante les électrolytes, ayant un espace de diffusion plus important, sont suffisamment retardés pour être séparés des protéines pour lesquelles l'espace de diffusion est plus restreint. On peut ainsi obtenir une solution de protéines, privée de sels minéraux, ou une solution de celles-ci dans un tampon.

Avec un Séphadex de réticulation plus lâche (G 100 et G 200) les protéines de plus faible poids moléculaire peuvent pénétrer à l'intérieur des grains du support. On obtient ainsi un fractionnement partiel en fonction du poids moléculaire (FOLDIN T. 30).

2- Technique.

Mettre le Séphadex dans un grand volume d'eau distillée ou de solution tampon et le laisser gonfler pendant 24 heures. Décanter le liquide surnageant et remettre en suspension dans la solution. Introduire cette suspension dans une colonne à chromatographie munie d'un entonnoir à la partie supérieure et d'une plaque de verre frittée, de porosité N° 2, à la partie inférieure. Laisser décanter. Avec un agitateur mettre en suspension la partie supérieure de la colonne de Séphadex pour l'obtenir parfaitement horizontale. Fixer cette surface avec un disque de polyurée, et laisser couler le liquide pendant quelques heures.

Pour la mise en route de la chromatographie, amener le liquide surnageant au niveau de la surface supérieure de la colonne. Déposer l'échantillon à l'aide d'une seringue munie d'un cathéter, le laisser pénétrer dans le Séphadex et rincer les parois avec quelques millilitres de solution.

Dans la partie expérimentale nous avons utilisé tout particulièrement la chromatographie sur Séphadex G 100 et G 200 en colonne de 50 cm. de hauteur et de 2 cm. de diamètre équilibrée avec un tampon tris-hydroxyméthylamino-méthane (0,1 M)-chlorure de sodium (1 M) pH 8,0 et développée avec ce même réactif. L'éluat est recueilli par fraction de 5 ml. dans un collecteur (M. 14, M. 34). On trace le chromatogramme par mesure de la densité optique à 2 780 Å, du contenu de chacun des tubes.

B. CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXYMETHYL CELLULOSE.

1- Principe :

Par action de l'acide chloro-acétique sur la cellulose en milieu alcalin, on obtient la carboxyméthyl-cellulose (PETERSON et SOBER T. 31), qui se comporte comme un échangeur de cations, tout en gardant l'inertie chimique et la porosité de la cellulose.

2- Technique :

Nous utilisons la technique de BELKORAVAINY et WINZLER, (T. 32) une colonne de carboxyméthylcellulose (M. 3) de 50 cm de hauteur et de 2 cm de diamètre, thermostatée à 4°. Le chromatogramme est tracé au fur-et-à-mesure de l'élution

avec un lecteur automatique (M. 29). L'élution est discontinuée et l'on change de tampon lorsque l'éluat n'absorbe plus la lumière à 2 537 Å. On utilise ainsi successivement les tampons suivants :

- R. 27 Tampon acétate de sodium 0,015 M. pH 4,1
- R. 28 Tampon acétate de sodium 0,025 M. pH 4,1
- R. 29 Tampon acétate de sodium 0,05 M. pH 4,1
- R. 30 Tampon phosphate de sodium 0,05 M. pH 7,3
- R. 31 Tampon phosphate de sodium 0,1 M. pH 7,3

C- ETUDE DES FRACTIONS CHROMATOGRAPHIQUES :

En fonction des enregistrements du chromatogramme et d'un contrôle éventuel par lecture photométrique à 2 780 Å on divise l'éluat en un certain nombre de fractions. Les tubes du collecteur correspondant à chaque fraction sont réunis, concentrés sur Séphadex G 25, dialysés et lyophilisés.

V. - ELECTROPHORESE DE ZONE.

A- ELECTROPHORESE SUR PAPIER A pH 8,6:

Nous opérons selon la technique de GRASSMANN et HANNING (T. 33, T. 34) avec un matériel ELPHOR (M. 11) tampon véronal sodique-acétate de sodium pH 8,6 - 0,1 M. -(R. 32) sous une tension de 110 volts pendant 18 heures, sur des papiers SCHLEICHER et SCHULL N° 2043 a Mgl de 20 mm de largeur (M. 23)

R. 32- Tampon véronal sodique-acétate de sodium pH 8,6 - 0,1 M

- Véronal sodique	29,4 g.
- Acétate de sodium	19,4 g.
- Eau distillée	3 l.
- Acide chlorhydrique normal	18 ml.

Ajuster à pH 8,6 \pm 0,1.

B- ELECTROPHORESE SUR PAPIER pH 3,9 (BISERTE T. 35)

Nous opérons avec le même matériel et les mêmes conditions qu'au chapitre précédent, mais avec un tampon pH 3,9 (R. 33).

R. 33- Tampon volatis pH 3,9

- Pyridine	30 ml.
- Acide acétique R.P.	100 ml.
- Eau distillée	5 l.

Ajuster à pH 3,9 \pm 0,1.

C- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AMIDON:

1. Principe :

Le gel d'amidon par sa forte teneur en matière solide constitue un excellent support pour électrophorèse de zone -(MORETTI, T. 36). Les protéines soumises à l'électrophorèse subissent en plus, une certaine filtration moléculaire au travers des mailles relativement étroites du support. La résolution est supérieure à celle obtenue avec tous les autres

supports pour électrophorèse de zone. De plus l'introduction de borate de sodium dans la composition des réactifs améliore la séparation des protéines.(BISERTE, T. 37). Nous utilisons les systèmes de tampons discontinus décrits par POULIK et SMITHIES (T. 38).

2- Réactifs :

R. 34- Tampon pour les bacs à électrodes :

Solution de borate de sodium 0,3 M. pH 8,2.

R. 35- Tampon pour la préparation du gel d'amidon :

Solution de tris-hydroxyméthylamino-méthane (0,076 M)-acide citrique (0,005 M) pH 8,7.

R. 36- Amidon hydrolysé :

L'amidon de pomme de terre (M. 2) est hydrolysé par l'acide chlorhydrique à 3 p. 100 dans l'acétone pendant un temps variable de 40 à 100 minutes suivant les lots et les quantités d'amidon mises en oeuvre. Après lavage pour éliminer les sels minéraux, l'amidon hydrolysé est deshydraté par l'acétone et séché à l'étuve 37°.

R. 37- Gel d'amidon :

Agiter vigoureusement 70 g. d'amidon hydrolysé (R. 36) dans 500 ml de tampon (R. 35). Chauffer la suspension sur un bec Bunsen, elle se prend en masse puis se fluidifie progressivement. Maintenir le chauffage jusqu'à ébullition.

Dégazer sous vide à l'aide d'une trompe à eau et verser immédiatement dans la cuve de l'appareil. Mettre en place le couvercle ce qui chasse l'excès de gel et assure une épaisseur constante. En outre, ce couvercle possède une empreinte qui ménage dans le gel, huit godets de dépôts.

Laisser refroidir pendant trois heures.

3- Technique :

Nous utilisons un appareil vertical, décrit par SMITHIES (T. 39) et BISERTE (T. 40) ; l'anode est reliée à la partie inférieure. Le champ électrique entraîne toutes les protéines vers l'anode, mais le courant d'électro-endosmose les pousse vers la cathode. Ce dernier est contre-balancé par le courant de liquide résultant de la différence des niveaux entre les deux bacs à électrodes. Dans ces conditions toutes les protéines, sauf les globulines gamma migrent vers la cathode.

Trois heures après la préparation du gel (R. 37), déposer les produits à analyser dans les godets avec une micropipette. Enduire le gel de vaseline pour éviter la dessiccation. Garnir les bacs de la cuve à électrophorèse avec le tampon R. 34. Etablir les ponts de connection avec une épaisseur de douze bandes de papier pour chromatographie, (M. 4- M23). Soumettre pendant 16 heures à une tension de 6 volts par cm.

Pour révéler, couper le gel en deux tranches à l'aide d'un fin fil métallique, colorer par le noir amido 12 BN (R. 42) et éliminer l'excès de colorant par lavage avec la solution R. 43.

D- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAR A pH 8,2

Nous opérons avec un matériel L.K.B. pour 18 lames (M. 27) et ELPHOR pour 12 lames (M. 11).

1- Réactifs :

R. 38- Tampon véronal sodique pH 8,2:

- Véronal sodique	35,7 g.
- Eau distillée	3 l.
- Acide chlorhydrique normal	60 ml.

Ajuster à pH 8,2 \pm 0,1.

R. 39- Gel d'AGAROSE à 1,5 p. 100.

Dans un erlenmeyer de 2 litres, mettre 15 g. d'Agarose (M. 1) Ajouter 50 ml d'eau distillée. Mélanger pour incorporer dans l'AGAROSE. Chauffer modérément. Lorsque la masse est fluide verser 435 ml. d'eau distillée. Mélanger et ajouter 500 ml de tampon pH 8,2 (R. 38). Porter à l'ébullition quelques instants, la masse devient transfluide. Agiter pour homogénéiser. Répartir en flacons d'environ 100 ml et laisser refroidir. Recouvrir de quelques millilitres de la solution de merthiolate (R. 40).

Une partie de notre expérimentation a été effectuée avec une gélose purifiée (M. 7). Les courants d'électroendosmoses sont d'intensité variable selon les gels.

R. 40 - Solution de merthiolate :

- Solution d'acide éthylmercurithiosalicylique (M. 13)	1 ml
- Eau distillée	100 ml

Les flacons contenant le gel d'AGAROSE sont bouchés avec un morceau de PARAFILM (M. 25) et conservés à 4°.

R. 41- Fixateur :

- Alcool à 95° 1 l.
- Acide acétique pur cristallisable 20 ml.

2- Préparation des lames :

Fluidifier au bain-marie 100° le contenu d'un flacon de gel d'Agarose (R. 39) après avoir éliminé la solution de merthiolate. Avec une pipette à écoulement total de 10 ml, préalablement chauffée, mesurer 3,3 ml de gel fluidifié sur une lame de verre type microscopie (75 x 25 mm). Opérer sur une table parfaitement horizontale. Cette opération demande un certain entraînement. Laisser refroidir et conserver en chambre humide.

3- Dépot de l'échantillon :

Découper des bandelettes de papier pour chromatographie Whatam N° 3 (M. 5) de 15 x 1 mm. Avec une petite pince déposer le papier sur la lame d'Agarose à 2,5 cm du côté qui sera relié au pôle négatif. Numérotter la lame avec une pointe en carbure de tungstène.

Avec une pipette Pasteur, déposer la solution de protéine à étudier sur la bandelette de papier et laisser l'Agarose absorber le liquide pendant environ 10 minutes. Si la solution est très diluée on peut effectuer plusieurs dépôts successifs.

4- Electrophorèse :

Assurer les contacts avec des bandes de papier SCHLEICHER et SCHULL N° 2043 (M/23). Soumettre à un potentiel électrique de 3 volts par centimètre pendant deux heures. Immédiatement après, immerger les lames dans le fixateur (R. 41) pendant 24 heures. Recouvrir d'une feuille de papier pour chromatographie et laisser sécher lentement pendant une nuit.

E. COLORATION DES ELECTROPHORESES :1- Révélation des protéinogrammes par le noir amido 12 BN,a- Réactifs :R. 42- Réactif colorant :

- Alcool méthylique	900 ml.
- Acide acétique (R.P.)	100 ml.
- Noir amido 12 BN (R.A.L)q.s.p	saturation

Laisser reposer plusieurs jours et filtrer avant emploi.

R. 43- Réactif de lavage :

- Alcool méthylique	800 ml.
- Acide acétique (R.P)	200 ml.
- Eau distillée	1000 ml.

b- Technique :

Après séchage quelques heures à l'air, mettre les bandes de papier à l'étuve à 110° environ 15 minutes.

Immerger dans le réactif colorant (R. 42) environ 20 minutes.
 Laver par plusieurs bains successifs de réactif de lavage (R. 43)
 Divers dispositifs automatiques facilitent cette opération
 (GIRARD T 41, T 42, T 43) (DEVRON T 44, AGNERAY T 45). Lorsque
 le fond du papier est parfaitement blanc, essorer et sécher.
 Si nécessaire l'évaluation quantitative est effectuée après
 élution de chaque zone colorée par un réactif alcalin et mesure
 de la densité optique à 625 m μ de la solution colorée obtenue
 (AGNERAY T. 46, T. 47 - FLEURY T. 48). Cette méthode pré-
 sente l'inconvénient de détruire la bande de papier. Si l'on
 désire conserver un document expérimental, il faut, soit ef-
 fectuer l'expérience sur plusieurs bandes de papier (ce qui
 généralement est facilement réalisable) soit opérer par une
 des techniques de photométrie directe.

2- Révélation des protéinogrammes par le vert de Lissamine :

a- Réactifs :

R. 44 - Réactif colorant :

- Vert de Lissamine (MICHROME) 15 g.
- Eau distillée 900 ml.
- Acide acétique (cristallisable) 100 ml.

R. 45 - Réactif décolorant :

- Acide acétique (pur cristallisable) 200 ml.
- Eau distillée 800 ml.

b- Technique :

Fixer les papiers à l'étuve à 110° pendant 15 minutes. Colorer par immersion dans le réactif colorant (R. 44) pendant 5 minutes. Laver par plusieurs trempages dans le réactif décolorant (R. 45) jusqu'à décoloration complète des fonds. Essorer et sécher.

3- Coloration des glycoprotéinogrammes par l'acide périodique : réactif de SCHIFF (P.A.S).

a- Principe :

Après oxydation périodique des polyosides on révèle les fonctions aldéhydes formées, par la fuchsine bisulfitée. Nous utilisons la méthode de MAC MANUS (T. 49 - T. 50) modifiée par LAURELL et SKOOG (T. 51) selon la technique décrite par BISERTE (T. 52) MONTREUIL (T. 53) et HAVEZ (T. 54). PERCHERON et PAQUIN ont récemment étudié les modalités de cette technique -(T. 55 et T. 56).

b- Réactifs :R. 46- Solution d'acide périodique :

- Paraperiodate trisodique (R.P)	9,2 g.
- Acide sulfurique normal	94 ml.
- Eau distillée	56 ml.
- Acétate de sodium M/5	75 ml.
- Alcool à 95°	500 ml.

Filtrer avant usage sur un papier pour chromatographie.

R. 47- Solution réductrice:

- Iodure de potassium (R.P) 20 g.
- Hyposulfite de sodium (R.P) 20 g.
- Eau distillée 400 ml.
- Alcool à 95° 150 ml.
- Acide chlorhydrique (R.P) 10 ml.

Mélanger, laisser reposer une heure, filtrer avant usage sur un papier pour chromatographie.

R. 48- Réactif de SCHIEFF : Formule de KRAMM et KOLB (T. 57)
et HOTCHKISS (T. 58).

Dissoudre 4,5 g. de fuchsine basique (R.A.L) dans 1 500 ml d'eau distillée. Ajouter 9,6 g. de métabisulfite de potassium. Laisser reposer une dizaine de minutes. Ajouter 40 ml d'acide sulfurique 6 N. Mélanger, boucher et laisser reposer jusqu'au lendemain. Décolorer par agitation avec 3 g. de Noir Norit. Filtrer rapidement sur une double feuille de papier Whatman N° 1 (M. 4).

Sur une prise d'essai de 10 ml. titrer l'anhydride sulfureux libre avec de l'iode N/10. Le réactif de SCHIEFF doit titrer 10 à 12 millimoles de $SO_2/100$ ml. Si nécessaire ajuster le réactif.

Ce réactif se conserve assez bien à l'obscurité à 4°. Il peut servir plusieurs fois à condition de réajuster son titre en anhydride sulfureux avant chaque emploi.

R. 49- Eau sulfitée : (faire extemporanément à l'éprouvette graduée)

- Méta^{bi}sulfite de potassium 4 g.
- Eau distillée 1 l.
- Acide chlorhydrique (R.P) 10 ml.

c- Technique :

Fixer les électrophorèses sur papier par l'alcool absolu. Les lames d'agarose sont fixées par le réactif (R. 41) avant séchage. Traiter par l'acide périodique (R. 46) exactement 2 minutes pour les papiers et 5 minutes pour les lames d'agarose. Laver à l'alcool à 70°. Décolorer complètement dans la solution réductrice (R. 47). Laver à l'alcool à 70°. Tremper exactement 15 minutes dans le réactif de SCHIFF (R. 48). Rincer trois fois cinq minutes avec l'eau sulfitée (R. 49). Fixer et deshydrater cinq minutes dans l'alcool absolu. Essorer entre deux feuilles de papier Whatman N° 1.

VI. - ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN VEINE LIQUIDE.

A. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE

Entre deux plaques de verre on réalise une chambre de faible épaisseur, contenant une solution tampon. Par introduction régulière de réactif à la partie supérieure, on crée un flux constant de liquide. Si à cette extrémité on introduit régulièrement en un point, une solution de protéines, celles-ci sont entraînées par le déplacement de liquide. Si on établit un champ électrique continu perpendiculairement à ce déplacement, les protéines vont se séparer en fonction de leur mobilité électrophorétique. On règle les conditions opératoires (pH, force ionique, nature du tampon, etc..) de façon à ce que les différentes protéines, après passage au travers de la chambre se répartissent sur toute la largeur du front de déplacement. Au bas de l'appareil, le flux de liquide est compartimenté en 48 fractions de largeur égale, qui sont recueillies séparément.

Nous avons utilisés un appareil Vap. Elphor (M. 12) pour électrophorèse continue en veine liquide avec les conditions opératoires suivantes (HANNIG T. 59).

- 2 300 à 2 400 volts - 160 mA.
- température thermostatée à $5\% \pm 1$.
- vitesse du flux de liquide : 110 ml/H.
- introduction dans la cuve de 2 ml/H. de solution à étudier contenant environ 25 mg/ml. de protéine.
- la chambre de séparation est alimentée avec le tampon. (R. 49)

R. 49- Tampon tris-hydroxyméthylamino-méthane (0,008 M)-acide citrique (0,008 M) à pH 8,6

- Tris-hydroxyméthylamino-méthane 48,5 g.
 - Solution d'acide citrique 2 M 19 ml.
 - Eau distillée 5000 ml.
- Ajuster à pH 8,6.

Les compartiments des électrodes sont remplis avec la solution tampon R. 50.

R. 50- Tampon pour le compartiment électrodes :

- Tris-hydroxyméthylamino-méthane 145,5 g.
- Solution d'acide citrique 2 M..... 64 ml.
- Eau distillée 5 l.

Pour tracer le diagramme du protéinogramme on mesure la densité optique à 2 780 Å de chacun des 48 tubes. Pour mettre en évidence l'hétérogénéité des différentes fractions nous dosons par technique chimique les protéines, les oses combinés et le tryptophane.

B. DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY

a- Principe :

La solution de protéine est dosée à la fois pour son pouvoir biurétogène (sulfate de cuivre en milieu alcalin et par le pouvoir réducteur des restes tyrosine et tryptophane sur le réactif phosphotungstomolybdique de FOLIN et CIOCALTEU (T. 60) selon une application à l'autoanalyseur (M. 33) de la méthode de LOWRY (T. 61), d'après la technique de BISERTE et Coll. (T. 62) MANDL. (T. 63).

b- Réactifs :

R. 51- Solution de sulfate de cuivre :

- Sulfate de cuivre 5 H₂ O (R.P) 1 g.
- Tartrate double de sodium et potassium 2 g.
- Eau distillée q.s.p. 1 l.

R. 52- Tampon alcalin :

- Bicarbonate de sodium 84 g.
- Eau distillée 500 ml.

Dissoudre à l'aide d'un agitateur magnétique.

D'autre part, dissoudre 45 g. de pastilles de soude (RP) dans environ 300 ml. d'eau distillée. Après refroidissement mélanger les deux solutions et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

R. 53- Réactif de FOLIN et CIOCALTEU (T. 64):

Dans un ballon de deux litres muni d'un réfrigérant à reflux introduire successivement :

- Tungstate de sodium 100 g.
- Molybdate de sodium 25 g.

- Eau distillée 700 ml.
- Acide phosphorique à 85 % 50 ml.
- Acide chlorhydrique RP 100 ml.

Porter à l'ébullition 10 heures, laisser refroidir et ajouter

- Sulfate de lithium 150 g.
- Eau distillée 50 ml.
- Brome quelques gouttes.

Agiter quelques minutes et porter à ébullition environ un quart d'heure pour éliminer l'excès de brome. Laisser refroidir. Compléter à 1 l. avec de l'eau distillée et filtrer. Conserver en flacons bouchés à l'abri de la lumière. Le réactif au moment de l'emploi doit être jaune et non vert, la coloration verte étant un signe de réduction.

R. 54- Dilution du réactif de FOLIN CIOCALTEU:

- Réactif R. 53 1 vol.
- Eau distillée 3 vol.

C- TECHNIQUE:

La figure n° 9 montre que la prise d'essai (tube N° 1 : orange) est mélangée au sulfate de cuivre (R. 51 : tube N° 2 : rouge) et au tampon alcalin (R. 52, tube N° 4 : violet et orange). On entrecoupe de bulles d'air (tube N° 3 : rouge) et on agite. Après addition du réactif de FOLIN et CIOCALTEU (R. 54, tube N° 5 : rouge) on passe par plusieurs bobines mélangeuses et on enregistre la coloration à 660 m μ . avec une cuve de 6 mm.

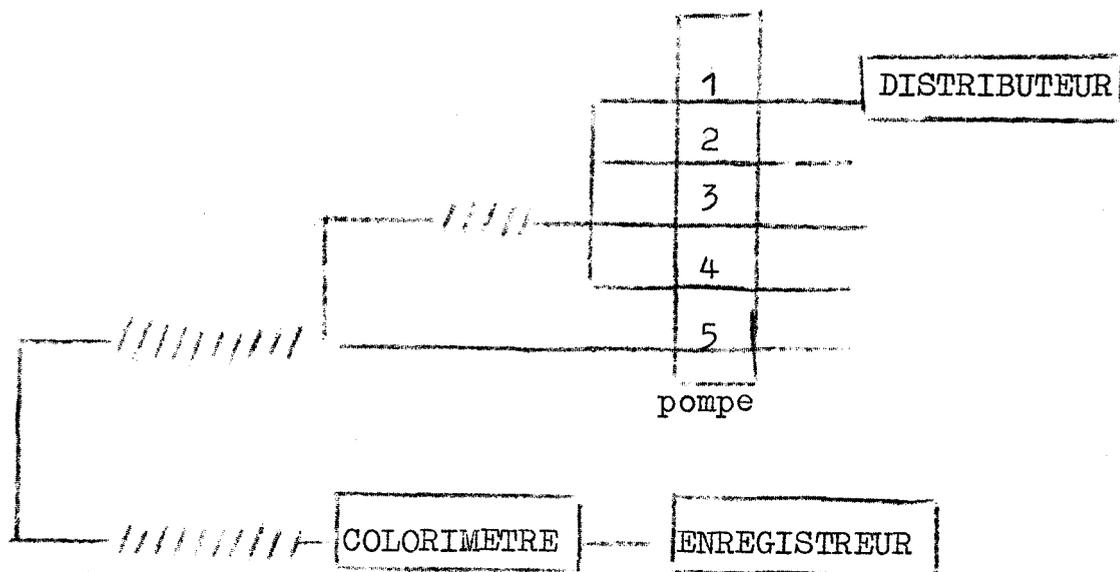


Figure 9 : Circuit d'analyse automatique pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY. (Chapitre VI. B.c)

BUS
LILLE

C- DOSAGE DES OSES REDUCTEURS LIBERES PAR HYDROLYSE :

a- Principe :

Le chauffage en milieu acide d'une solution de glycoprotéine entraîne une rupture plus ou moins accentuée des liaisons osidiques. Les oses libérés dans ce milieu acide, se furfuralisent. Les dérivés du furfural obtenus sont différents selon qu'il s'agit d'un pentose, d'un méthylpentose ou d'un hexose. Ils se condensent à des vitesses variables avec divers phénols comme l'orcinol. L'étalonnage doit de préférence être effectué avec un mélange de sucres dans des proportions analogues à celle qui se trouve dans la glycoprotéine étudiée (MONTREUIL T. 65). Lorsque l'on étudie des mélanges de glycoprotéines on étalonne la réaction colorée avec des solutions d'hexoses ce qui donne des mesures semi-quantitatives, suffisantes pour le tracé d'un glycoprotéinogramme.

Nous utilisons la méthode de TILLMANS et PHILIPPI (T 66) modifiée par RIMINGTON (T 67 - T 68) selon une adaptation à l'analyse automatique (DAUTREVAUX, T 69).

b- Réactif:

R. 55- Solution sulfurique d'orcinol :

- Orcinol 1,6 g.
- Solution normale d'acide sulfurique 100 ml.
- Acide sulfurique 80 p. 100 (v/v)q.s.p 1 l.

c- Technique :

Comme on le voit figure N° 10, la prise d'essai (tube N° 1 ; noir) est diluée par l'isopropanol, aspirée pour

compléter le débit du tube N° 2 : orange. Le mélange est injecté dans un flux de réactif R. 55 (tubes N° 3 et 5 : "aciflex" diamètre : 1,8 mm) entrecoupé de bulles d'air (tube N° 4 : orange). On mélange par passage dans une bobine et on régularise l'échauffement par une circulation d'eau. Après incubation dans un bain-marie à 80°, on enregistre la coloration à 520 mμ.

D- DOSAGE DU TRYPTOPHANNE COMBINÉ :

a- Principe

Comme tous les dérivés de l'indole, le tryptophane donne une combinaison colorée avec le réactif d'ERLICH. Nous utilisons la technique de SPIES et CHAMBERS (T. 70) adaptée à l'analyse automatique (DAUTREVAUX T. 71). On étalonne avec des solutions de tryptophane.

b- Réactifs :

R. 56- Réactif d'ERLICH

- p.diméthylamino-benzaldéhyde 3g.
- acide sulfurique 60 p. 100 (v/v) 1 l.

R. 57- Nitrite de sodium à 0,04 g p. 100.

c- Technique :

La prise d'essai (tube N° 1 : noir) entrecoupée de bulles d'air (tube N° 2 ; noir) est mélangée avec le réactif R. 56 (tube N° 3 : jaune). On agite dans une bobine réfrigérée par une circulation d'eau et on laisse incubé la réaction à 20°. On introduit le réactif R. 57 (tube N° 4 : noir) on passe par des mélangeuses et on effectue la lecture colorimétrique à 660 mμ avec une cuve de 6 mm. (voir figure N° 11)

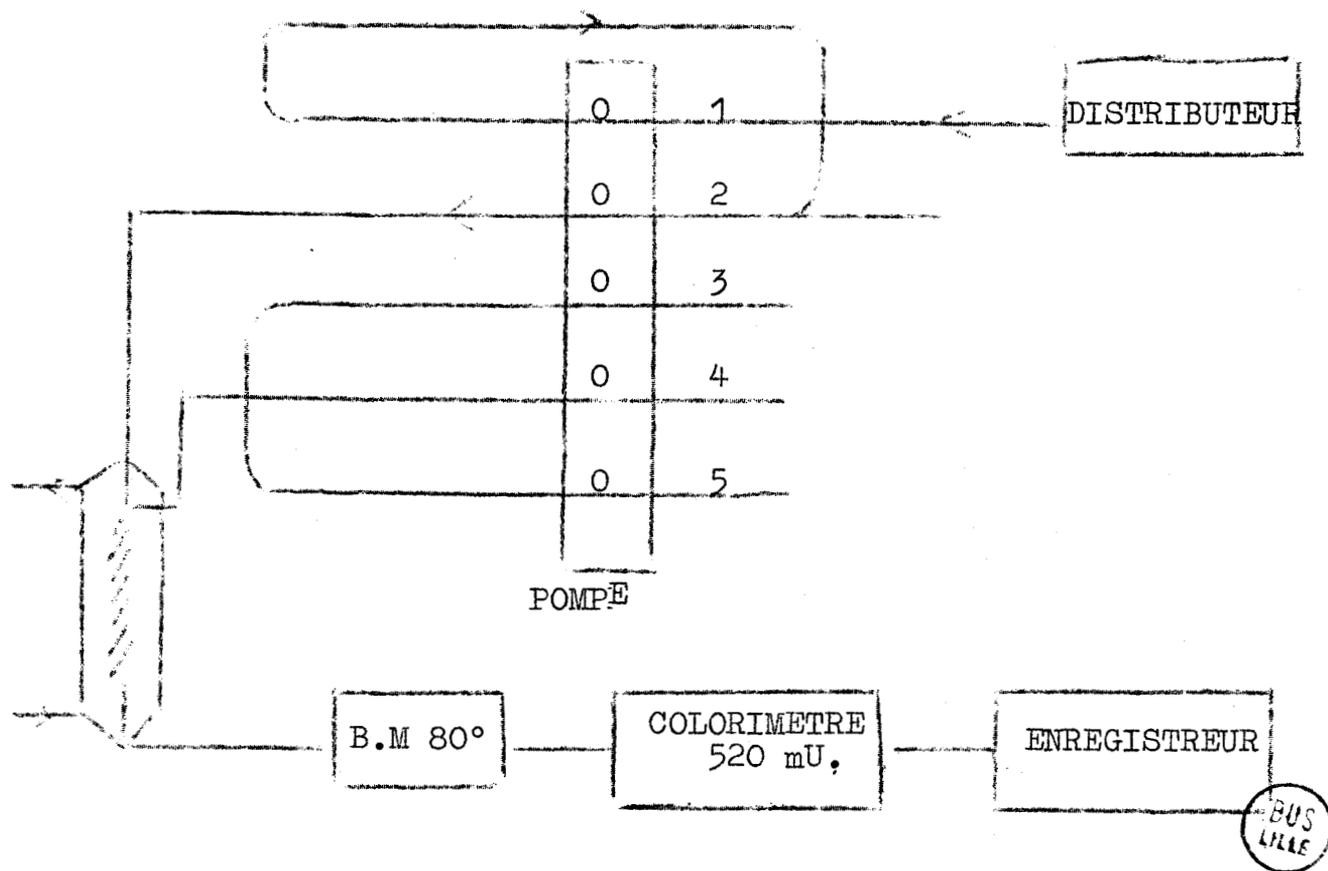


Figure N° 10 : Circuit pour le dosage automatique des oses réducteurs libérés par hydrolyse.
(Chapitre VI C. c)

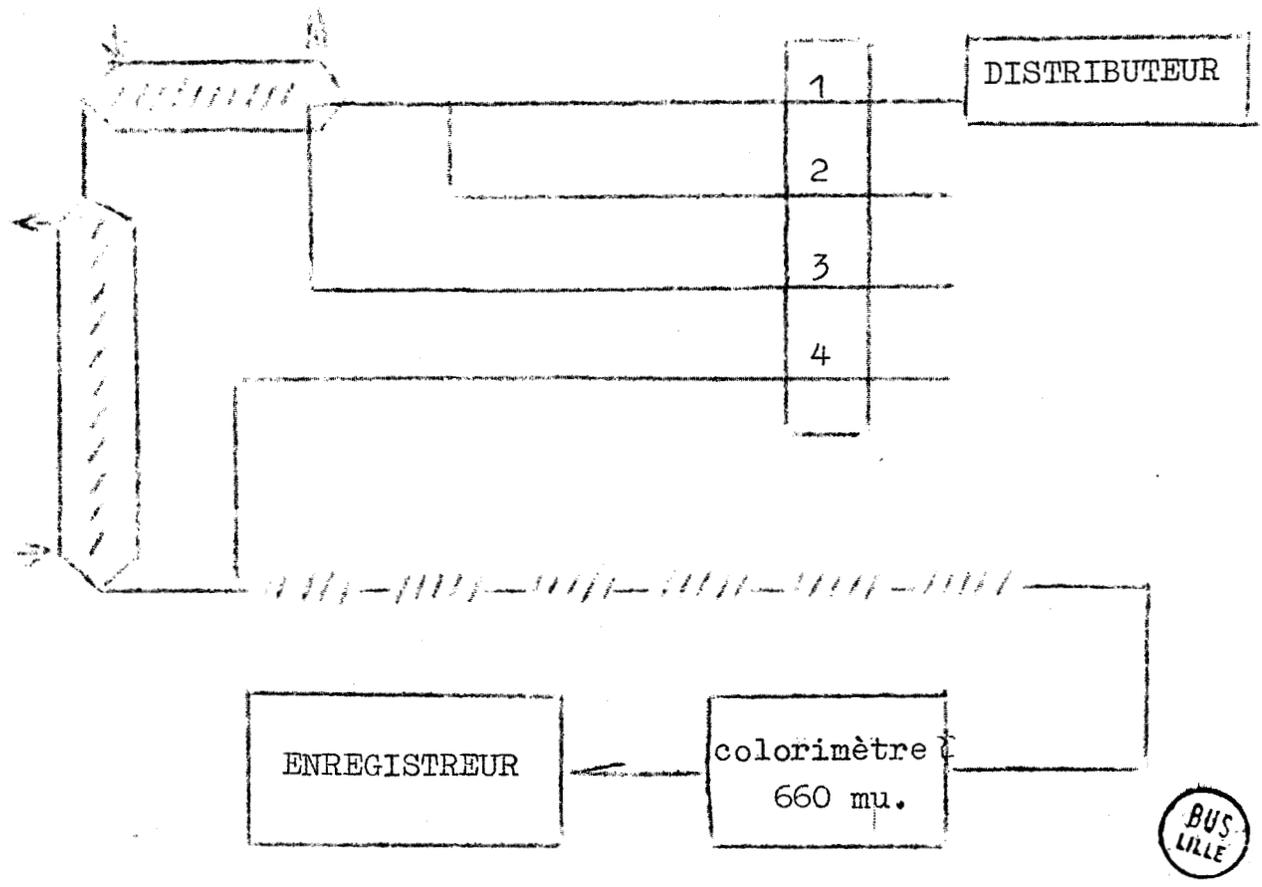


Figure N° 11 : Circuit pour le dosage automatique du Tryptophanne combiné (chapitre VI. Dc)

VII. - IMMUNOCHIMIE DES PROTEINES.

A- IMMUNOELECTROPHORESE :

1. Principe

On effectue une électrophorèse sur gel d'agar à pH 8,2. Après séparation électrophorétique on dispose dans une rigole parallèle au sens de déplacement un sérum d'un animal (cheval ou lapin) immunisé contre les protéines à étudier. Les protéines séparées par électrophorèse et les anticorps apportés par les immunserums diffusent l'un vers l'autre créant un gradient de concentration. Lorsqu'en un lieu donné le titre en antigène est équivalent à celui des anticorps, il se produit une précipitation du complexe antigène-anticorps, qui s'insolubilise dans le sein du gel d'agar. Les protéines non précipitées sont facilement lavées par une solution isotonique de chlorure de sodium. Les arcs de précipitation sont colorés par le noir amido 12 BN (GRABAR, T. 72), (SCHEIDEGGER, T. 73) (HIRSCHEFELD, T. 74).

2. Technique :

Les lames d'agarose sont préparées comme pour l'électrophorèse de zone en gel d'agar (Chapitre V. D) Avec un emporte pièce spécial (L.K.B M. 28) on découpe dans le gel une rigole centrale de 3 mm de large sur 65 mm de long. De part et d'autre de cette rigole, à 7 mm. de celle-ci et à 25 mm. du côté de la lame reliée au pôle négatif on creuse avec un trocart un trou cylindrique de 2 mm de diamètre.

Le pôle positif étant placé à gauche on dispose dans le trou supérieur une solution de protéine à étudier. Le trou inférieur est destiné à recevoir une solution de référence, le plus généralement un sérum humain normal.

On pratique l'électrophorèse comme au chapitre V. D. et immédiatement après cette séparation on remplit la rigole centrale avec un immunsérum. On laisse diffuser 48 heures en chambre humide et tremper 24 heures dans une solution de chlorure de sodium à 9 g./l. On dépose sur les lames un morceau de papier pour chromatographie et on laisse sécher une nuit.

Nous utilisons comme immunsérums les sérums équins N° 223 et 306 antiprotéines sériques humaines de l'Institut Pasteur (M. 39). Pour un travail de routine le mélange à partie égale des sérums N° 223 et 306 donne de bons résultats. Pour une autre partie de notre expérimentation nous avons utilisé des immunsérums de lapin anti-extrait phytique préparés selon la technique que nous décrivons au chapitre VII. E.

3- Coloration :

R. 58- Réactif colorant :

- Noir amido 12 BN 1 g.
- Alcool méthylique 400 ml.
- Acide acétique (R.P) 100 ml.
- Eau distilléeq.s.p. 1 l.

Placer les lames dans une boîte à coloration en matière plastique (boîtes pour 20 lames : M. 26). Colorer quelques minutes avec le réactif (R. 58). Rincer à plusieurs reprises avec le réactif (R. 43). Laisser dans le dernier bain quelques heures. Essorer entre deux feuilles de papier filtre et laisser sécher à l'air.

En général le fond des lames est encore fortement coloré ce qui rend l'interprétation des lames assez difficile. Pour obtenir des fonds de lames parfaitement incolores, tremper quelques minutes dans le tampon pH 8,2 (R. 38) en agitant et en surveillant constamment la décoloration. Lorsque l'aspect de la lame est satisfaisant, fixer environ cinq minutes dans l'acide acétique pur cristallisable et laisser sécher à l'air.

Dans certains cas particuliers, nous avons opéré avec un seul trou pour le dépôt de la solution de protéine au milieu de la lame avec une rigole à 7 mm de part et d'autre. Cette disposition est surtout intéressante pour comparer l'action de deux immunsérums différents sur un même mélange de protéines.

B. IMMUNODIFFUSION (Technique d'OUCHTERLONY, T. 75)

1- Principe :

On dispose de part et d'autre d'une rigole contenant un immunsérum plusieurs solutions de protéines. La diffusion se produit comme pour l'immunoélectrophorèse, il se forme autour de chaque dépôt une série d'arcs de précipitation.

- a- Si deux arcs correspondants à deux dépôts voisins se rejoignent pour former un seul arc de forme sinusoïdale on peut conclure que dans les deux solutions étudiées il y a un constituant antigénique commun.
- b- Si un arc d'un mélange coupe les arcs de précipitation du mélange voisin, on peut conclure que la protéine correspondant à ce premier arc, ne figure pas dans la composition du second mélange.

2- Technique :

Pour faciliter l'interprétation il faut limiter le nombre de protéines entrant dans la composition de chaque solution à étudier. Les conditions de diffusion sont fixées en fonction de la concentration en protéine et de l'efficacité des immunsérums. Nous avons étudié plusieurs types de schémas.

1- sur une lame pour microscopie (25 x 75 mm) garnie d'agarose on découpe une rigole centrale de 3 x 65 mm comme pour l'immunoélectrophorèse. De part et d'autre à 7 mm de cette rigole on creuse avec un trocart une série de 5 trous de 2 mm. de diamètre. Sur la rangée supérieure les trous sont espacés de 12 mm, sur la rangée inférieure les écarts entre deux trous sont de 16 mm.

2- sur une lame de verre de 90 x 12 mm. on coule 18 ml. de gel d'agarose (R. 39). Parallèles au côté de 90 mm. on découpe 3 rigoles de 3 mm. de largeur écartées entre elles de 33 mm. Les deux rigoles extrêmes se trouvent à 24 mm. des bords. On peut ainsi creuser 4 rangées de 5 trous de 2 ou 4 mm. de diamètre éloignées d'environ 16 mm. d'une ou deux rigoles. L'écart entre deux trous voisins est choisi entre 12 et 16 mm. en fonction des résultats des essais préliminaires. Ce dispositif présente l'avantage de pouvoir étudier sur un seul dépôt l'action de deux immunsérums différents.

On traite les lames exactement comme pour la révélation des immunoélectrophorèses (chapitre VII. A).

C- DIFFUSION CONTROLATERALE d'une solution antigénique à identifier : technique d'OSSERMAN (T. 76).

On pratique l'électrophorèse sur gélose d'un mélange de protéine sur une lame d'agarose munie de deux rigoles latérales à 7 mm de part et d'autre du point de départ. Une des rigoles reçoit un immunsérum convenable qui fournit une série d'arcs classiques de l'immunoélectrophorèse. Dans l'autre gouttière on dispose une solution de protéines provoquant la diffusion d'une série d'antigènes selon un front parallèle à celui du front de diffusion des anticorps de l'immunsérum. A équivalence de titre il se produira une ligne de précipitation sur toute la longueur de la lame. Si une protéine du mélange déposé dans la gouttière est identique à un constituant du mélange soumis à l'électrophorèse cette ligne de précipitation se raccorde avec l'arc correspondant de l'immunoélectrophorèse.

Cette technique permet l'identification de certaines protéines avec celles contenues dans les solutions de référence.

D- EPUISEMENT D'IMMUNSERUM PAR UN MELANGE DE PROTEINES CONNUES.

Si l'on met en contact une protéine ou un mélange de protéines avec un immunsérum, il se produit une précipitation du complexe antigène - anticorps. Après repos une heure à 37° on centrifuge. L'immunsérum obtenu est privé des anticorps correspondants aux protéines utilisées pour le saturer. La difficulté réside dans la détermination du poids de protéines nécessaire pour saturer les anticorps d'un sérum. Tout excès de l'un ou de l'autre des antagonistes provoque une redis-

solution du complexe antigène -anticorps.

Le sérum du sang du cordon ombilical ne contient pas de gamma A, de gamma M, de lipoprotéine, d'haptoglobine, ni de céruloplasmine. Après saturation d'un immunosérum par les protéines du sérum du cordon on obtient un réactif ne contenant plus que les anticorps correspondants à ces protéines.

E- IMMUNISATION D'UN LAPIN CONTRE UN MELANGE DE PROTEINES:

1- Principe :

On injecte par voie intra-péritonéale à un lapin de la préparation de protéines On stimule la fabrication d'anticorps par le lapin à l'aide d'un traitement par le zymosan (HAVEZ T. 77) (NEUHAUS, T. 78) .

2- Réactifs :

R. 59- Solution de zymosan

Zymosan (M. 42)	70 mg.
Solution de chlorure de sodium 9 g/l	20 ml.

Porter 10 minutes au bain-marie bouillant, laisser sédimenter
Conserver à 4°.

R. 60- Antigène de Freund:

huile de vaseline	3 parties
lanoline	1 partie
tampon de MICHAELIS physiologique pH 7.	4 parties
B.C.G tué à l'étuve 100°, 24 H. 1 mg/ml. de liquide.	

Dissoudre un peu de monooléate de glycérol dans l'huile de vaseline, poser l'huile sur la phase aqueuse. Mélanger à la seringue ; l'émulsion est de bonne qualité si une goutte tombant dans une éprouvette d'eau donne une sphère.

A la fin de notre expérimentation nous avons aussi utilisé une préparation commerciale (antigène de FREUND complet M. 6) qui nous a donné toute satisfaction.

3- Technique :

On choisit de préférence un lapin mâle assez jeune (environ 1 kg 500) que l'on soumet à un régime riche en légumes verts. On lui fait la série d'injections selon le programme suivant :

- 1er, 2ème et 3ème jours : injection intraveineuse de 3 ml de R. 59.

- Si l'on ne désire pas commencer immédiatement l'immunisation on entretient la réactivité du lapin avec une injection intra-péritonéale hebdomadaire de 3 ml. de solution R. 59.

- dans le cas contraire le 13ème et le 14ème jour : injection intra-péritonéale du mélange :

solution R. 59	0,2 ml.
antigène	20 mg.
soluté de Na Cl à 9 g/l	1 ml.

- le 15ème et le 16ème jour : injection intrapéritonéale du mélange :

solution R. 59	0,4 ml.
antigène	40 mg.
soluté de Na Cl 9 g/l	2 ml.

- Le 20ème jour : injection intrapéritonéale du mélange :
- | | |
|----------------------------------|---------|
| antigène | 100 mg. |
| soluté de Na Cl à 9 g/l | 1 ml. |
| antigène de FREUND (R. 60) | 1 ml. |
- Le 50ème et le 75ème jour : injection intra-péritonéale du mélange :
- | | |
|-------------------------------|--------------|
| antigène | 40 à 100 mg. |
| soluté de Na Cl à 9 g/l | 1 ml. |
- A partir du 30ème jour, prélever quelques millilitres de sang, centrifuger et tester en utilisant le sérum pour révéler une ou plusieurs immunoélectrophorèses. En général les immunoserums sont utilisables à partir du 50ème jour. Quand l'activité du sérum est satisfaisante, saigner le lapin, laisser décanter le sang hépariné, prélever le plasma en évitant l'hémolyse et le lyophiliser.

VIII. - FRACTIONNEMENT D'UN MELANGE DE PROTEINES PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.

A. PRINCIPE :

La solubilité d'une protéine est, entre autre, fonction de la force ionique. L'expression quantitative a été établie par COHN (T. 79) et étudiée par DERRIEN (T. 80)

$$(I) \quad \log \frac{S}{S_0} = Z_1 Z_2 \frac{0,5\sqrt{I_{AC}}}{1 + b/\sqrt{I_{AC}}} - Ks_{AC}$$

S et S_0 = solubilité de la protéine.
 Z_1 et Z_2 = la valence des ions.
 μ = la force ionique.
 b = constante.
 K_s = constante de relargage.

Cette équation (I) rend compte de l'action dualiste des sels neutres, lesquels à faible concentration déterminent la solubilisation des protéines (premier terme du second membre) et à forte concentration provoquent leur relargage (second terme du second membre).

Dans le cas des fortes concentrations :

$$Z_1 Z_2 \frac{0.5 \sqrt{\mu}}{1 + b \sqrt{\mu}} = \text{constante} = K$$

On peut écrire :

$$(2) \quad \log S = \log S_0 + K - K_s \mu$$

$$(3) \quad \log S = \log S_0 - K_s \mu$$

Si les concentrations au lieu d'être rapportées à 1 000 g. d'eau solvante le sont à 1 000 ml de solution, l'équation (3) prend la forme usuelle suivante :

$$(4) \quad \log S = \log S_0 - K'_s \mu/2$$

Par ailleurs la solubilité d'une protéine est fonction du pH et il faudra donc contrôler ce facteur. La solubilité des sels neutres étant fonction de la température, il faut la définir et surtout éviter toutes variations importantes de celle-ci pendant le fractionnement. Nous avons pratiqué tous nos relargages à la température du laboratoire.

B- TECHNIQUE

Afin de limiter les phénomènes de coprécipitation, il est préférable de ne pas opérer le fractionnement sur une solution trop concentrée. Pratiquement on dilue le sérum au demi de façon à obtenir une concentration inférieure à 35 g/l. Pour ajuster la concentration en sulfate d'ammonium au pourcentage de saturation désirée, on peut choisir entre deux méthodes :

1- Ajuster la concentration en sulfate d'ammonium ; par addition d'un volume calculé de solution saturée de ce sel.

R. 61- Solution saturée de sulfate d'ammonium :

- Sulfate d'ammonium R.P 2 500 g.
- Eau distillée 3 l.

Laisser en contact une journée en agitant périodiquement. Laisser reposer pendant une nuit. Le lendemain placer sous agitation magnétique pendant plusieurs heures. Filtrer avant usage. Conserver à température constante.

Calcul du volume de réactif nécessaire :

Mesurer le volume de la solution à traiter. Ajouter le volume de réactif R. 61 déterminée par la formule suivante :

$$Y = \frac{100 (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

S_1 : concentration de départ exprimée en pourcentage de la saturation

S_2 : concentration à obtenir.

Y : nombre de ml de solution saturée (R. 60) à ajouter à 100 ml de solution de concentration S_1 pour obtenir (100 + Y) de solution de concentration S_2 .

Cette technique est très pratique pour les concentrations inférieures à 50 p. 100 de la saturation. Au-delà de 50 p. 100 on utilise la deuxième méthode.

2- Ajuster la concentration en sulfate d'ammonium par addition d'un poids calculé de sulfate d'ammonium cristallisé.

- Si G = nombre de grammes de sulfate d'ammonium dans un litre de solution saturée (à 20° G = 536,34)

V = volume apparent spécifique de sulfate d'ammonium dans une solution saturée (à 20° V = 0,5414).

x = nombre de grammes de sulfate d'ammonium R.P à ajouter à 100 ml. de solution de concentration S₁ pour obtenir une solution de concentration S₂.

$$x = \frac{0,1 G (S_2 - S_1)}{1 - \frac{VG S_2}{1000}}$$

si l'on opère à 20° la formule devient.

$$x = \frac{53,63 (S_2 - S_1)}{1 - (0,29 S_2)}$$

3- Méthode utilisée :

- serum ou plasma humain 1 vol.

- soluté de chlorure de sodium 9 g/l. . 1 vol.
100

Amener à 33 p. saturation par addition d'un volume nécessaire de sulfate d'ammonium (R. 60). Ajuster le pH à 6 avec de l'ammoniaque 6 N ou de l'acide sulfurique 6 N. Agiter Laisser reposer quelques heures. Le précipité sédimente et laisse un surnageant limpide. Centrifuger à température constante.

a- Le précipité est immédiatement redissout dans un volume suffisant de soluté de chlorure de sodium à 9 g/l. La solution obtenue est dialysée contre eau courante pendant plusieurs jours dans un boudin de cellophane (M. 41). On concentre comme nous l'avons décrit par ailleurs (chapitre I. C 4). Les euglobulines précipitent lors de la dialyse. Il est souvent plus intéressant de les séparer par centrifugation à 4° et de redissoudre cette sous-fraction dans un soluté de chlorure de sodium à 9 g/l).

b- Le surnageant est amené à la concentration désirée en sulfate d'ammonium et au pH choisi pour la précipitation suivante.

Chaque fraction ainsi obtenue est définie par ses conditions de précipitation et par celles de la fraction précédente; par exemple : fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre X M. pH A et Y M. pH B. Nous reproduisons tableau N° XII. de la partie expérimentale les zones de relargage actuellement admises pour les glycoprotéines du sérum.

IX. - PREPARATION DE L'EXTRAIT PERCHLORIQUE DU SERUM SANGUIN

Afin de pouvoir comparer la composition des extraits perchloriques et phytiques nous avons préparé des extraits perchloriques 0,2 N selon les techniques de de VAUX SAINT-CYR et GRABAR (T. 81) et de SCHULTZE, HEIDE et HAUPT (T. 82).

Technique : Dans un récipient convenable mélanger :

- sérum humain	100 ml.
- soluté de chlorure de sodium à 9 g/l	200 ml.
- Eau distillée	800 ml.
- acide perchlorique 0,75 N	400 ml.

Tous les réactifs sont amenés préalablement à une température de 4°. On centrifuge le plus rapidement possible avec une centrifugeuse réfrigérée à 4° et on neutralise immédiatement le liquide surnageant. On pratique successivement la dialyse, la concentration et la lyophilisation comme pour l'extrait phytique (chapitre I. C, 4).

X. - FRACTIONNEMENT DES PROTEINES PAR LE RIVANOL.

A. Principe :

Le lactate de diamino (6,9)-éthoxy. (2) acridine ou Rivanol possède la propriété de précipiter dans certaines conditions la plupart des protéines. Seules quelques glycoprotéines sont plus ou moins solubles dans ce réactif (partie expérimentale : dixième chapitre II). Le pH, la force ionique du milieu et la concentration en Rivanol interviennent dans ce phénomène.

B. Réactif :

R. 62- Solution tamponnée de Rivanol.

- Rivanol 24,9 g.
- Solution de phosphate de sodium
M/200 pH 8,0 1 l.

C. Technique :

Dans un récipient convenable mélanger :

- sérum ou plasma 1 vol.
- soluté de chlorure de sodium à 9 g/l. 1 vol.
- Solution de Rivanol (R. 62) 1 vol.

Vérifier le pH qui doit rester voisin de 8,0 et laisser reposer une à deux heures en agitant périodiquement. Il se forme un précipité abondant que l'on sépare du surnageant par filtration sur un papier pour chromatographie (M. 4 et M. 23).

Le Rivanol est éliminé de ces fractions par addition d'une solution de chlorure de sodium à 5 p. 100 dans laquelle il est peu soluble. On élimine le reste de ce Rivanol par dialyse prolongée contre eau distillée fréquemment renouvelée. Les adialysables sont lyophilisés.

||

||

||

- BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE TECHNIQUE -

 Les numéros entre parenthèses qui suivent les références correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte

- AGNERAY J.
 Ann. Biol. Clin. 1961, 19, 115 (T 3 - T 19)

- AGNERAY J. - MILHAUD J.C. et ORABONA G.
 Protides of the Biological Fluids. Neuvième colloque de Bruges : 1961, (Elsevier Publishing Company - Amsterdam (1962) (T 46)

- AGNERAY J. - MILHAUD J.C. - ORABONA G.
 Ann. Biol. Clin. 1960, 18, 645 (T 47)

- AGNERAY J. - WEPIERRE J. et PUISIEUX F.
 Ann. Biol. Clin. 1959, 17, 251 - (T 45)

- ASSOUS E. - DREUX C. et GIRARD M.
 Ann. Biol. Clin. 1960, 18, 319 (T 18)

- BELKOROVAINY A. et WINZLER R.J.
 Biochem. Biophy. Acta 1961, 49, 559 (T 32)

- BERTHELOT M.
 Repert. de Chimie Appliquée, 1859, 254 (T 10, T 13)

- BISERTE G.
 Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39 (Supp. N° 3-93 (T 52)

- BISERTE G.
 Ann. Biol. Clin. 1955, 13, 254 (T 40)

- BISERTE G. - BRETON A. - HAVÉZ R. et FONTAINE G.
 Lille Médical 1958, 3, 3 (T 35)

- BISERTE G. - HAVEZ R,
Clin. Chim. Acta 1959, 4, 33 (T 37)
- BISERTE G. - HAVEZ R. - HAYEM A. et LATURAZE J.
C.R. Ac. Sci. 1960, 250, 418 (T 1)
- BISERTE G. - LEVY A. et HAVEZ R.
Cancerologie 1957, 3 - 7 (T 62)
- COHN M. - DEUTSCH H.F. et WETTER L.R.
J. Immunol. 1950, 64 - 381 (T 79)
- COURTOIS J.E. et AGNERAY J.
Ann. Biol. Clin. 1961, 19 - 91 (T 5, T 20)
- COURTOIS J.E. et AGNERAY J.
Ann. Biol. Clin. 1961, 19, 101 (T 4, T 8)
- COURTOIS J.E. et AGNERAY J.
Path. et Biol. 1961, 9, 1377 (T 6, T 21)
- CROWTHER A.B. et LARGE R.S.
Analyst 1956, 81, 64 (T 11)
- DAUTREVAUX M.
Communication personnelle. (T 69, T 7)
- DERRIEN Y.
Thèse Doct. Sciences Physiques, Marseille 1946 (T 80)
- DEVRON B.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 34, 921 (T 44)
- FENTON J.B.C
Clin. Chim. Acta 1962, 7, 163 (T 12)

- FERRARI A.
Ann. of the New York Acad. Sci. 1960, 87, 792
(T 16, T 22, 24)
- FLEURY P. et COURTOIS J.E.
Fiches techniques de Chimie Biologique. 7ème suppl.
sang N° 33. Edit. Véga - Paris (1961) (T 48)
- FLEURY P. et EBERHARD R.
Ann. Pharm. Fr . 1958, 16, 465 (T 15)
- FOLDIN P.
Dextran gels and their application in gel filtra-
tion, Pharmacia - UPPSALA - Suède. (T 29 - T 30)
- FOLIN ^{O.} et CIOCALTEU V.
J. Biol. Chem. 1927, 73, 627 (T 60, T 64)
- GIRARD M.
Pratique de l'électrophorèse sur papier G. DOIN et Ci
Paris 1958 (T 43)
- GIRARD M. - ASSOUS E. et CANAL J.
Ann. Biol. Clin. 1959, 17, 592 (T 17)
- GIRARD M. et ROUSSELET F.
Bull Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 1089 (T 41)
- GIRARD M. et ROUSSELET F.
Ann. Biol. Clin. 1957, 15, 240 (T 42)
- GRABAR P. et BURTIN P. Analyse immunoélectrophorétique
Masson et Cie. Edit. Paris (1960) (T 72)

- GRABAR P. - VAUX SAINT-CYR Ch. de et CLEVE H.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 853 (T 2)
- GRASSMANN^{N.} et HANNIG K.
Hoppe Seyler's Physiol. Chem. 1952, 209, I (T 33)
- GRASSMANN W. - HANNIG K. et KNEDEZ M.
Deutsch. Med. Woch. 1951, 76, 333 (T 34)
- HANNIG K.
Z. Anal. Chem. 1961, 181, 244 (T 59)
- HAVEZ R.
Thèse Doctorat. Med. Lille 1956 (T 54)
- HAVEZ R. - BONTE M. et MOSCHETTO Y.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1965, 47, 223 (T 77)
- HENRY J. et CHATELAIN S.
Ann Biol. Clin. 1964, 22, 143 (T 9)
- HIRSCHFELD J.
Science Tools. 1961, 8, 17 (T 74)
- HOTCHKISS R.D.
Arch. Biochem. 1948, 16, 131 (T 58)
- KRAMM D.E. et KOLB C.L.
Ann. Chem. 1955, 27, 1079 (T 57)
- LAURELL C.B. et SKOOG N.
Scand. J. Clin. Lab. Invest 1956, 8, 21 (T 51)

- LOWRY O.H. - ROSEBROUGH N.J. - FARR A.L. - RANDALL R.J.
J. Biol. Chem. 1951, 193, 265 (T 61)
- LUBOCHINSKY B. et ZALTA J.P.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1363 (T 14)
- MANDL R.H.
Protides of the Biological Fluids. Neuvième colloque de Bruges (1961). Elsevier Publishing company - Amsterdam (1962) 81 (T 63)
- MAC MANUS J.F.A
Nature 1946, 158, 202 (T 49)
- MAC MANUS J.F.A
Nature 1956, 178, 914 (T 50)
- MISSON G.
Chem. Ztg. 1908, 32, 633 (T 7)
- MONTREUIL J. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chem. Biol. 1959, 41, 959 (T 53)
- MONTREUIL J. et SPIK G.
Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux
Faculté des Sciences - Lille (T 65)
- MORETTI J.
Ann. Biol. Clin. 1963, 21, 47 (T 36)
- NEUHAUS O.
Communication personnelle. (T 78)
- OSSERMANN E.
J. Immunol. 1960 84, 93 (T 76)

- OUCHTERLONY O.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1949, 26, 507 (T 75)

- PAQUIN R.
Thèse Doct. Pharm. Paris 1962 (T 56)

- PERCHERON F. et PAQUIN R.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 43, 367 (T 55)

- PETERSON E.A. et SOBER H.A.
J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 751 (T 25, T 31)

- PETERSON E.A. et SOBER H.A.
Anal. Chem. 1959, 31, 857 (T 26)

- POULIK M.D. et SMITHIES O.
Biochem J. 1958, 68, 636 (T 38)

- RIMINGTON C.
Biochem J. 1931, 25, 1062 (T 67)

- RIMINGTON C.
Biochem. J. 1940, 34, 931 (T 68)

- SCHEIDEGGER J.J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39 1er supp. 45 (T 73)

- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Clin. Chim. Acta 1962, 7, 854 (T 82)

- SKEGGS L.
Methodology Technicon. Method File N° 4 2-59 (T 27)

- SMITHIES O.
Biochem. J. 1955, 61, 629 (T 39)
- SPIES J.R. et CHAMBERS D.C.
Anal. Chem. 1949, 21, 1249 (T 70)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K.
Biochem. Z. 1929, 215, 36 (T 66)
- VAUX SAINT-CYR Ch. de - COURCON J. de - GRABAR P.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 579 (T 81)
- WHITEHEAD E.C.
Protides of the biological fluids. Neuvième colloque
Bruges (1961) - Elsevier Publishing company
Amsterdam (1962) 70 (T 23)
- ZALL D.M. - FISHER D. et GARNER M.O.
Ann. Chem. 1956, 28, 1665 (T 28)



- P A R T I E E X P E R I M E N T A L E -
=====

I N T R O D U C T I O N

=====

HISTORIQUE.

L'acide inositohexaphosphorique ou acide phytique se combine à de nombreuses protéines pour donner un précipité à un pH généralement compris entre 2 et 4. Celui-ci se solubilise par alcalinisation légère du milieu et se reforme par acidification. En solution alcaline l'acide phytique et la protéine semblent libres et peuvent être extraits par les méthodes habituelles.

La combinaison protéine - acide phytique existe à l'état naturel surtout dans le règne végétal. LINDENBAUM (1) et MNICH (2) l'isolent des graines de fève. Depuis, divers auteurs ont décrit des combinaisons analogues : PISCHINGER (3) pour les graines de chanvre, WIAZOWNICKA (4) pour les graines de blé, FONTAINE (5) pour les graines de cotonnier et de pois.

COURTOIS (6) et BARRE (7, 8, 9) retrouvent ce phénomène en étudiant l'amando-albumine et l'amando-globuline. Ils prouvent que la "caséine d'amande" n'est autre qu'une combinaison d'amando-albumine et d'acide phytique.

Cette précipitation phytique fut généralisée à de nombreuses protéines : protéines sériques par HELLOT et MACHEBOEUF (10) et ovalbumine par MATTSON et KOUBLER-ANDERSON (11).

COURTOIS (12) et BARRE (13, 14, 15) trouvent avec de nombreux dérivés phosphorés acide, une réaction assez comparable, mais de tous les composés étudiés l'acide phytique donne les réactions les plus nettes. Ceci s'explique par l'accumulation de six restes orthophosphoriques sur une molécule de méso-inositol, donnant ainsi une grande densité de fonctions acides, régulièrement réparties autour d'une petite molécule de cyclohexane.

Ces auteurs (BARRE 16, 17) proposent l'interprétation suivante de la précipitation des protéines par l'acide phytique : dans une zone optimale de pH, les fonctions acides de l'acide phytique salifient les fonctions basiques ionisées des protéines. Il y aurait, d'une part une diminution du nombre des charges électriques et d'autre part, une modification de la disposition spatiale de la protéine ; ce qui entraînerait la précipitation. Une variation de pH modifie le degré d'ionisation des fonctions et la combinaison se redissout.

Les fonctions basiques des protéines sont représentées par les fonctions amines terminales ainsi que par les fonctions ϵ -aminées de la lysine, les groupes guanidyle de l'arginine et les noyaux imidazole de l'histidine. Une désamination par l'acide nitreux fait disparaître 75 p. 100 des liaisons entre l'acide phytique de l'amando-albumine (BARRE 19)

L'aldéhyde formique peut réagir avec de nombreux groupes ionisés des protéines : fonctions amine, thiol, amide, groupement guanidique et noyau indole (FRAENKEL - CONRAT 21, 22); mais son action sur les fonctions amines est réversible quand le pH est inférieur à 6. Après action du formaldéhyde à pH 10 suivi de dialyse prolongée, BARRE (22 - 23) acidifie le milieu en présence d'acide phytique : dans ces conditions l'amando-albumine ne fixe plus que 70 p. 100 de la quantité d'acide phytique qu'elle capte normalement.

COURTOIS, BARRE (24) et WORMSER (25) tracent les courbes de titration et de conductivité de l'acide phytique, ce qui les conduisent à proposer une structure intermédiaire entre celles données par NEUBERG (26) et ANDERSON (27, 28, 29) (voir chapitre I. F. et figure N° 2). Ils étudient l'influence du pH sur la combinaison acide phytique - protéine (amando-albumine, sérum-albumine humaine et salmine) ainsi que celle de la présence de traces de calcium, de magnésium et de zinc.

DELRIEU (30) utilise l'acide phytique pour l'étude des groupements basiques des protéines du sérum sanguin et de l'urine. Il signale des variations importantes en pathologie humaine.

COURTOIS (31) MALANGEAU et CHABRE (32) étudient par électrophorèse sur papier la composition du liquide surnageant après précipitation phytique du sérum sanguin humain. Certaines glycoprotéines, les beta-séromucoïdes acides et les glycoprotéines acido-solubles se retrouvent dans ce surnageant phytique. Ces auteurs signalent des phénomènes de

compétition entre les fonctions acides des glycoprotéines et celles de l'acide phytique. L'héparine joue un rôle inhibiteur assez puissant puisqu'il faut douze fois plus d'acide phytique pour obtenir une précipitation normale de 20 mg. de sérum-albumine en présence de 20 mg. d'héparine. Ce phénomène ne se retrouve pas avec des glycoprotéines riches en acide sialique comme l'orosomucoïde de WEIMER et le pleuro-mucoïde de MICHON (COURTOIS 33, 34).

BARRE (35, 36) et LABÁT (37) se sont surtout attachés à l'étude de solutions diluées de protéines et à l'utilisation de l'acide phytique comme réactif défécant de micro-prélèvements de sérum sanguin en vue d'examen biochimiques multiples sur des prises d'essais réduites. Ils sont amenés à étudier l'influence de divers cations (sodium, calcium et magnésium) sur le pourcentage de précipitation des protéines sériques et de la sérum-albumine humaine par l'acide phytique. Ils étudient par électrophorèse sur papier la composition du précipité phytique du sérum sanguin humain.

Cette thèse se place dans le prolongement de cette importante suite de travaux. Dans les premiers chapitres nous étudions le mode de combinaison de l'acide phytique avec certaines protéines et surtout l'influence de certains paramètres sur cette réaction de précipitation. Nous étudions ensuite les propriétés physico-chimiques du liquide surnageant et nous cherchons à identifier les composants phytosolubles du sérum sanguin.

- PREMIER CHAPITRE -

I. - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ACIDE PHYTIQUE ET DE SES SELS.

A. Etat naturel -modes d'obtention- :

L'acide inositohexaphosphorique ou acide phytique est très répandu dans le règne végétal où il se trouve à l'état de sels et de combinaisons phospho-organiques. Les organes de réserve en sont généralement riches et les farines constituent d'excellentes matières premières pour son extraction. On effectue généralement un traitement préalable par l'alcool bouillant, afin de détruire la phytase (BOURQUELOT, 38) et par l'éther pour éliminer les phospholipides. Il faut libérer l'acide phytique de ses combinaisons généralement peu solubles dans l'eau. Par exemple dans la graine de fève, l'acide phytique est combiné au calcium, au magnésium et aux protéines. A pH 6,7 on peut extraire 92 % de cet acide alors qu'à pH 3 les combinaisons sont pratiquement insolubles. A pH 1 la totalité du phosphore phytique est extractible (COURTOIS, 39). C'est pourquoi on traite le plus souvent par une solution d'acide chlorhydrique à 2 % ou d'acide trichloracétique à 10 % qui présente l'avantage d'insolubiliser les protéines.

Dans la technique de POSTERNAK (40 - 41), on extrait par l'acide chlorhydrique dilué. Le perchlorure de fer précipite le phytate ferrique qui est lavé à l'eau distillée et redissout dans un minimum de soude. On filtre et par addition d'alcool au filtrat on provoque la précipitation du phytate de sodium. On redissout dans un minimum d'eau distillée au bain-marie. Par repos au réfrigérateur à 4° C, il se forme des cristaux clinorhombiques de phytate de sodium.

Dans une autre technique (CANALS 42) on précipite le phytate de cuivre à pH 3,5. Après lavage à l'eau distillée la suspension est traitée par l'hydrogène sulfuré qui élimine l'ion cuivre à l'état de sulfure et libère l'acide phytique.

WORMSER (43) précipite le ~~phosphate~~ hexabarytique par addition progressive de chlorure de baryum à une solution de phytate de sodium. Après lavage abondant par l'eau distillée à 60° C. le précipité est traité par une quantité exactement calculée d'acide sulfurique, pour libérer l'acide phytique et précipiter le baryum sous forme de sulfate.

Pour usage analytique il est préférable de préparer les solutions d'acide phytique par passage d'une solution de phytate de sodium sur une colonne d'échangeur de cations sous forme acide (voir partie technique : chapitre I. B- 1)

B. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le phytate de sodium (M. 17) est le sel de l'acide phytique le plus utilisé. Le produit commercialement disponible répond à la formule: $C_6H_6O_{24}P_6Na_{12} \cdot 38 H_2O$ (P.M. = ~~1058~~ 1608)
 A l'étuve à 120° C ce sel perd 39,3 p. de son poids pour donner un composé de formule :



C'est une poudre cristalline blanche, soluble dans l'eau. Un léger chauffage au bain-marie facilite la dissolution. L'insolubilité du phytate de sodium dans l'alcool permet de le purifier. Les solutions aqueuses sont très alcalines (pH 12 et plus).

L'acide phytique est très soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et l'éther. Les solutions aqueuses sont très acides. La molécule est assez stable. L'hydrolyse chimique est difficile surtout en milieu alcalin. L'eau de baryte à 180° C. ne provoque qu'une hydrolyse minime après 30 heures. On peut identifier l'inositol libéré après un chauffage à 230° pendant 24 heures avec de la soude à 20 p. 100 (WINTESTEIN, 44). En milieu acide (acide sulfurique au demi ou au tiers) l'hydrolyse est totale en 10 heures à 170° (WINTESTEIN, 45), (ANDERSON 46 et HART 47). Une solution d'acide phytique peut s'hydrolyser spontanément. ANDERSON (48) constate la libération de 12 p. 100 du phosphore en dix huit mois. Un chauffage à 105° pendant 48 heures entraîne l'hydrolyse de 75 p. 100 des liaisons esters. FLEURY (49) démontre qu'à 120° la vitesse d'hydrolyse est maximale à pH 3. Elle diminue progressivement lorsque le pH augmente pour devenir infime au-dessus de pH 9. A pH inférieur, à 3, l'hydrolyse est plus lente, mais toutefois en solution très acide (5 N et plus) elle s'accélère considérablement.

C. HYDROLYSE PAR LA PHYTASE

1- Description de la phytase.

L'hydrolyse de l'acide phytique est plus facilement réalisée par l'action de la phytase qui est une phytosphatase (FLEURY 50, PERLES 51). Le pH optimum de son activité se situe entre 5 et 5,6. Cette action sur l'acide phytique la différencie des phosphatases alcalines d'origine animale et des phosphatases acides du règne végétal. En effet, on trouve dans de nombreuses graines, à côté de la phytase, une phosphomonoestérase banale appartenant au type II de la classification de ROCHE et COURTOIS (52). Cet enzyme qui agit sur une gamme étendue de monoesters orthophosphoriques d'alcools ou de phénols, se montre par contre incapable d'attaquer les esters penta et hexaphosphoriques de l'inositol. Les esters tri et tétraphosphoriques sont déjà plus sensibles à l'action de l'enzyme tandis que l'acide inositol monophosphorique constitue un substrat aisément hydrolysable (COURTOIS 53).

La phytase possède un champ d'action plus étendu elle effectue l'hydrolyse des esters monophosphoriques sensibles à l'action des phospho-monoestérases banales et de plus scinde les esters penta et hexaphosphoriques de l'inositol. L'attaque de la molécule d'acide phytique par la phytase se réalise de façon progressive, les six fonctions esters n'étant pas rompues simultanément. Les radicaux phosphoriques se détachent les uns après les autres comme le démontrent les expériences de S. et Th. POSTERNAK (54). Après libération d'une première molécule d'acide orthophosphorique, l'hydrolyse de l'ester inositopenta-phosphorique résultant se poursuit par l'attaque de la fonction ester située en position méta par rapport à l'hydroxyle libre (DESJOBERT 55). La chromatographie sur papier a par la suite permis de déceler les cinq esters du méso-inositol qui apparaissent successivement au cours de l'hydrolyse de l'acide phytique par la phytase du son de blé.

Au cours d'essais de purification des phytases de diverses graines (blé, seigle, radis, moutarde blanche etc..) au moyen des techniques de fractionnement par les sels ou par les solvants organiques (FLEURY, 56), COURTOIS (57, 58, 59, 60) et PERLES (61) ont pu réaliser la séparation de la fraction correspondant à la phosphomonoestérase banale de celle douée d'activité phytasique. Jusqu'ici il n'a pas été possible d'obtenir une fraction enzymatique agissant sur l'acide phytique mais dépourvue d'action sur les esters monophosphoriques. A l'inverse, ces auteurs ont toujours isolé une fraction hydrolysant les mono-esters orthophosphoriques mais totalement inactive sur l'acide phytique.

2- Application analytique de la phytase :

Nous avons reproduit les expériences d'hydrolyse phytasique de ces auteurs dans le but de mettre au point une méthode de dosage de l'acide phytique à la fois spécifique et plus facile à réaliser que la minéralisation totale.

Nous avons préparé des extraits à activité phytasique élevée (1 mg. hydrolyse plus de 0,3 mEq d'acide phytique soit 0,025 mM.) Pour cela on agite des graines de seigle, préalablement concassées ou du son de blé dans une solution de chlorure de sodium à 2,5 p. 100. Sur le filtrat limpide on opère un relargage par l'acétone à 4°C. (MASSON 62).

L'application analytique de ce réactif enzymatique présente quelques difficultés :

- La préparation phytasique doit être étalonnée avec chaque série de dosages.

- L'hydrolyse totale est longue à obtenir.

- L'Hydrolyse partielle fournit un mélange complexe d'acide phytique, de méso-inositol ainsi que de tous les intermédiaires en proportion variable d'une expérience à l'autre. Il nous a été impossible d'obtenir des conditions d'hydrolyse partielle donnant des résultats satisfaisants.

- Enfin nous avons vu que la phytase n'était pas spécifique de l'acide inositohexaphosphorique, mais pouvait également hydrolyser la plupart des autres esters orthophosphoriques ce qui limite l'intérêt de cette technique dans le cas d'analyses d'extraits phytiques contenant d'autres dérivés organiques du phosphore.

D. AUTRES SELS DE L'ACIDE PHYTIQUE.

Les autres sels de l'acide phytique sont préparés à partir de l'acide inositohexaphosphorique ou du phytate de sodium. A part les sels de cations alcalins, la plupart des phytates sont insolubles à l'intérieur d'une certaine zone de pH. Ils sont dissociés en milieu acide et les sels précipitent plus ou moins rapidement lors de la neutralisation.

Le phytate de zinc précipite dès pH 3 (WORMSER 63). On le prépare par mélange de solutions tamponnées à pH 4 d'acétate de zinc et d'acide phytique. Le précipité est lavé par l'alcool à 70°, puis redissout dans l'ammoniaque 12 N. On peut doser le zinc du précipité et du liquide surnageant par le complexon III en milieu ammoniacal à pH 10, en présence de noir d'ériochrome. Cette technique fournit une excellente méthode de dosage volumétrique de l'acide phytique (MALANGEAU 64).

Le phytate ferrique est insoluble dans l'acide chlorhydrique à 2 p. 100 et l'acide trichloracétique à 10 p. 100. Dans ces conditions le phosphate ferrique est soluble. Nous avons vu que cette propriété est mise à profit pour l'extraction de l'acide phytique. On peut également effectuer un dosage volumétrique de l'acide inositohexaphosphorique par une solution titrée de perchlorure de fer en présence de thiocyanate d'ammonium (HEBNER 65). Par colorimétrie de l'ion ferrique en excès, on peut également doser l'acide phytique (TOFFOLO & YOUNG 67).

La "mixture magnésienne" précipite l'acide phytique en même temps que les phosphates. C'est d'ailleurs une des rares propriétés communes aux ions phytique et orthophosphorique (PEREZ 72). Le phytate d'argent est précipité au-dessus de pH 2. Il est soluble dans l'ammoniaque. C'est un composé photosensible. On a décrit deux sels de plomb : un à 4, l'autre à 9 atomes de plomb par molécule d'acide phytique. Le premier précipite à pH 2,5, le second à pH 5,6 (BROWN 73).

A l'examen de toutes ces propriétés chimiques, on peut constater l'absence de réaction colorée permettant la recherche et éventuellement le dosage de l'acide phytique, surtout en présence de protéines. C'est pourquoi, comme tous nos prédé-

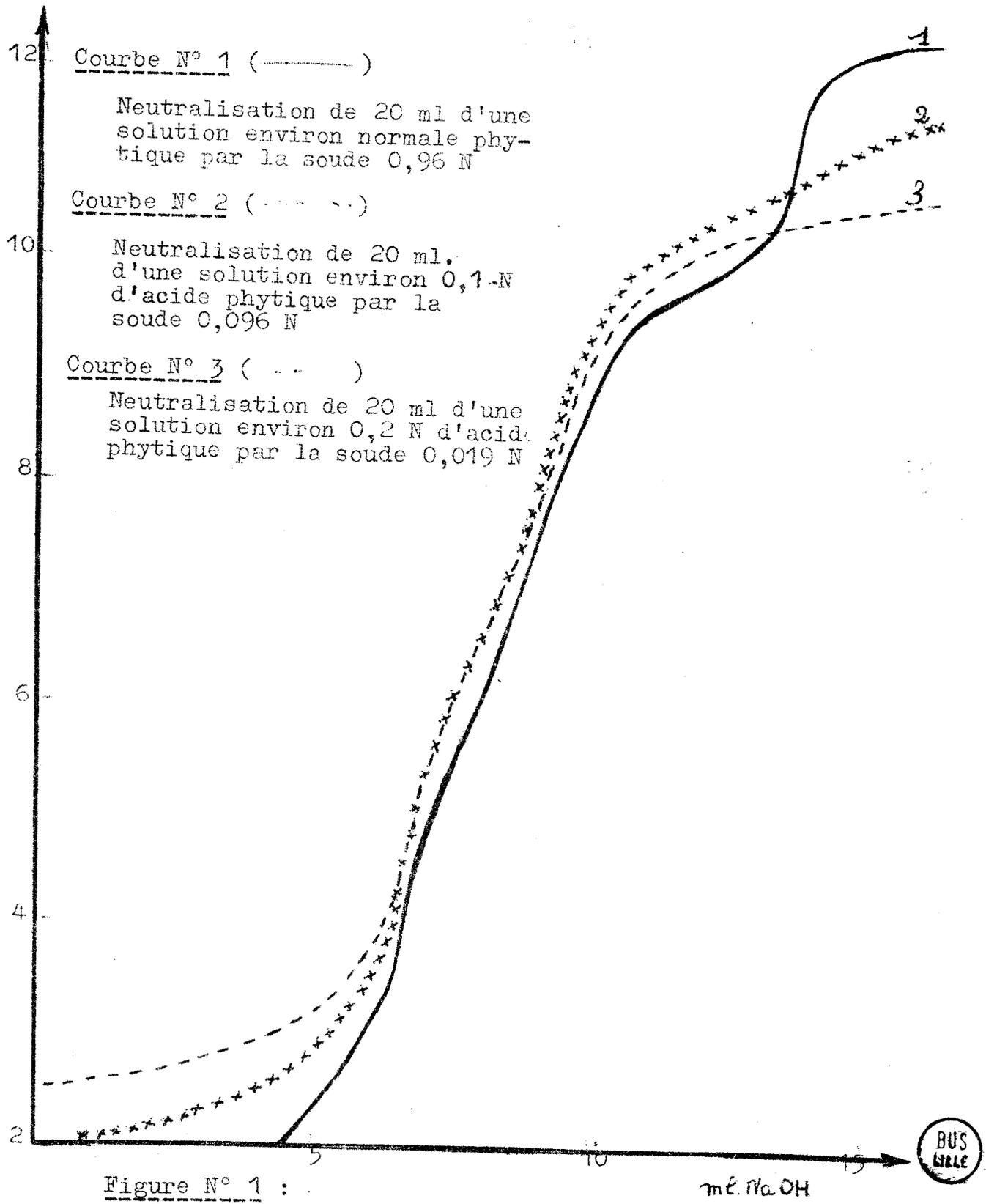
cesseurs nous avons été dans l'obligation d'effectuer les dosages après une minéralisation de nos prises d'essais (COURTOIS 74). On obtient quantitativement de l'acide ortho-phosphorique que l'on dose avec le réactif nitro-vanado-molybdique de MISSON (75) (COURTOIS 76). C'est la technique de dosage de l'acide phytique la plus utilisée pour les mesures précises. Elle n'est applicable que pour des prélèvements ne contenant pas d'autres dérivés phosphorés.

E- Courbes de titration :

Le tracé potentiographique de la neutralisation d'une solution M/12 d'acide phytique par de la soude normale permet d'identifier 12 fonctions acides par molécule. Un premier point d'équivalence voisin de pH 5 représente la neutralisation de six acidités fortes ($pK \neq 2$). Enfin, vers pH 11 on enregistre la neutralisation de quatre acidités très faibles ($pK \neq 9,5$).

En solution plus diluée (voisine de M/120)) ce dernier point d'inflexion est peu marqué. Il n'apparaît plus pour des solutions M/600 (voir figure N° 1). Pour la préparation d'une solution titrée d'acide phytique il est donc recommandé d'effectuer le dosage potentiographique sur une solution mère assez concentrée (au moins voisine de normale) et de faire ensuite les dilutions nécessaires pour obtenir le titre désiré.

La courbe de titration du phytate de sodium par l'acide chlorhydrique permet de mettre en évidence quatre acidités très faibles et deux acidités faibles. Il est très difficile de localiser avec précision le point d'équivalence correspondant aux six acidités fortes. En utilisant l'acide perchlorique en solution aqueuse, on obtient un tracé tout à fait comparable. On peut donc étalonner une solution de



Courbes de neutralisation de l'acide phytique par la soude.

phytate de sodium au moyen d'un acide fort en prenant comme point d'équivalence la première inflexion de la courbe qui est la plus marquée. Elle correspond au quatre douzième du titre en ion phytique.

En solution non-aqueuse (acide acétique + anhydride acétique) le dosage du phytate de sodium par l'acide perchlorique dilué dans l'acide acétique cristallisable met en évidence un seul point d'équivalence correspondant à 18 acidités par molécule (BROWN 77).

L'acide phytique possède donc 18 fonctions acides par molécule :

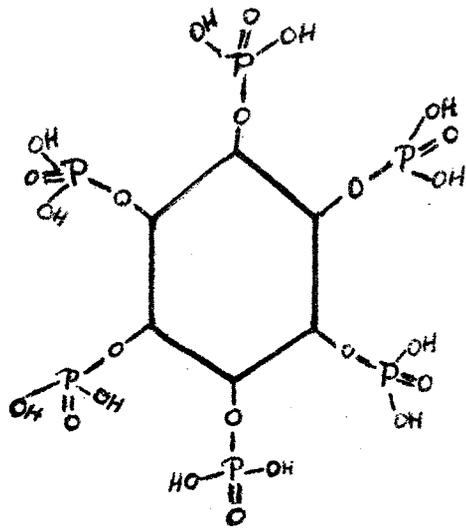
- six acidités fortes (pK \neq 2).
- deux acidités faibles (pK \neq 6).
- quatre acidités très faibles (pK \neq 9,5).
- six acidités extrêmement faibles décelables uniquement en protométrie non aqueuse.

Nous avons vu qu'en solution voisine de normale il est facile de détecter avec suffisamment de précision le point d'équivalence correspondant à la neutralisation par la soude de 12 fonctions acides par molécule d'acide phytique. Par ailleurs, le phytate de sodium le plus couramment utilisé comporte 12 ions sodium par molécule. Nous prendrons donc le douzième de molécule gramme comme définition de l'équivalent d'acide phytique. Dans tout ce qui va suivre nous exprimerons la concentration de nos réactifs en normalité ainsi définie sans préjuger du nombre d'acidités réagissant effectivement dans chaque cas particulier.

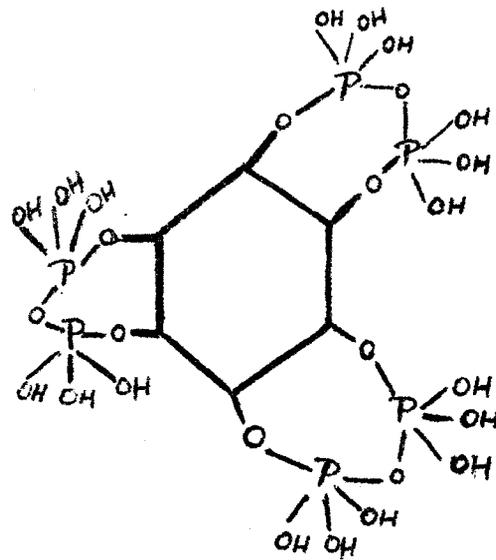
F- Formule de l'acide phytique :

Les très nombreuses recherches effectuées depuis plus d'un demi siècle n'ont pas encore permis d'attribuer à l'acide phytique une formule pouvant tenir compte de toutes les propriétés physico-chimiques de cette molécule. Actuellement trois formules sont discutées par les auteurs. La formule d'ANDERSON représente l'acide phytique comme un ester hexamonoorthophosphorique de l'inositol (78-79). NEUBERG (80-81) le considère comme un ester de l'acide trihydroxy phosphorique de SANFOURCHE (82-83). Le choix en faveur de l'une ou l'autre de ces deux formules découle de l'étude de la salification de l'acide phytique par divers cations. Les sels alcalins correspondent à la formule d'ANDERSON. Les sels de métaux plurivalents et certains sels mixtes orientent plutôt vers la formule de NEUBERG, tant par leur composition centésimale (FISCHLER 84), (OTOLSKI 85) (POSTERNAK 86) que par leur courbe de dosage potentiographique du phytate de sodium par des solutions de ces cations (BROWN 87).

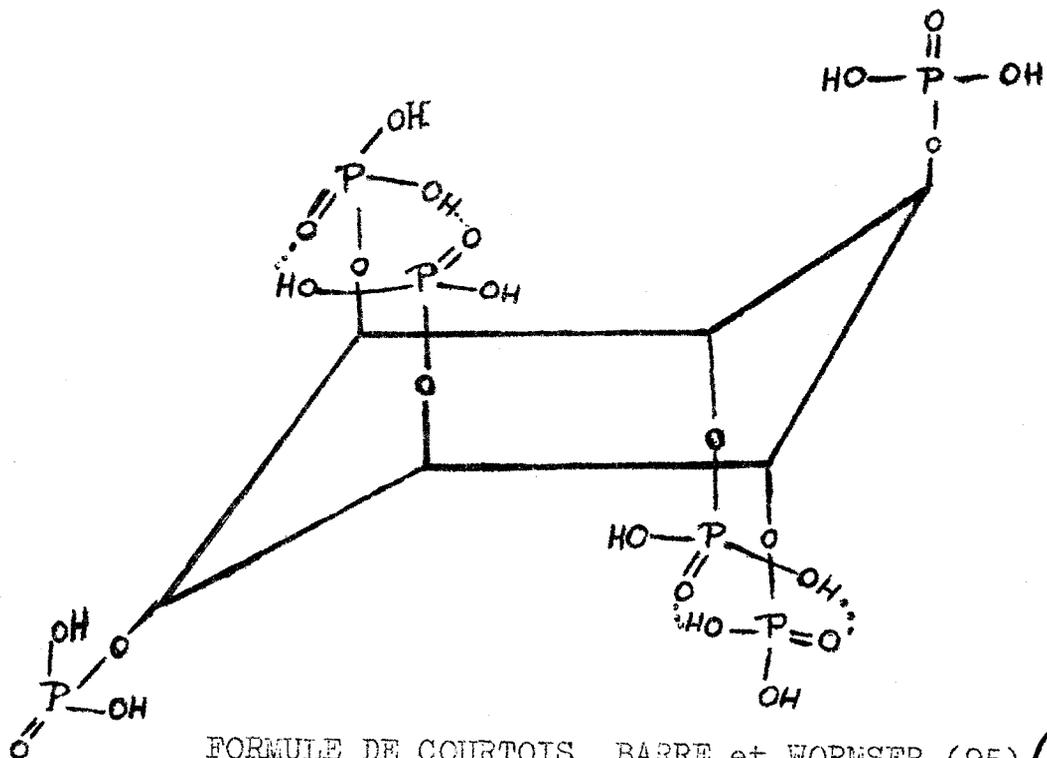
Pour BARRE (88), COURTOIS et WORMSER (89) l'interprétation des courbes de titration et de conductivité est plutôt en faveur de la formule d'ANDERSON, mais dans ce cas on devrait trouver six acidités faibles équivalentes et non deux faibles et quatre très faibles comme nous l'avons vu au paragraphe précédent. C'est pour tenir compte de ces faits expérimentaux que ces auteurs ont proposé la formule reproduite sur la figure N° 2. La présence de quatre liaisons hydrogène permettait de justifier la répartition des acidités. BROWN et coll. (90) suggèrent que l'acide phytique pourrait exister sous deux formes ne différant que par trois molécules d'eau.



FORMULE D'ANDERSON (91-92)



FORMULE DE NEUBERG (93-94)



FORMULE DE COURTOIS, BARRE et WORMSER (95)



Figure N° 2 : Formules proposées pour l'acide phytique.

- DEUXIEME CHAPITRE -

=====

COMBINAISON DE L'ACIDE PHYTIQUE AVEC LES PROTEINES :

Nous avons vu plus haut que l'acide phytique à pH voisin de 2 se combine à de nombreuses protéines avec formation d'un précipité de phytate de protéine. COURTOIS, BARRE et WORMSER y voient une liaison électrostatique entre les fonctions acides de l'acide phytique et les groupements basiques des protéines. Pour exprimer leurs résultats ils utilisent le mode d'expression suivant :

$r =$ nombre de molécules d'acide phosphorique estérifié sous forme d'acide phytique combiné à 10^5 g. de protéine.

Dans cette définition des unités l'introduction d'une référence à un poids conventionnel de protéine permet de comparer les protéines entre elles même si l'on ignore leur poids moléculaire et permet d'étudier les mélanges de protéines (BARRE 96) (WORMSER 97).

Un peu plus tard BARRE, COURTOIS, DELRIEU et PERLES (98) continuant cette importante série de travaux, concluent qu'une fonction acide par reste orthophosphorique de l'acide phytique se combine à un groupement basique de la

protéine. L'acide phytique réagit donc uniquement par ces six acidités fortes. Le nombre d'atomes de phosphore du précipité correspond donc au nombre de groupements basiques qui ont réagi. Le nombre d'atomes d'azote du précipité donne la quantité de protéine, combinée à l'acide phytique. Ces auteurs définissent donc le "Nombre de groupements basiques totaux" d'une protéine ou Nb : c'est le nombre de groupements cationiques totaux d'une protéine d'un poids moléculaire conventionnel de 100 000 et renfermant 16 p. 100 d'azote total (COURTOIS 99).

Soit $\frac{P}{N}$ le rapport pondéral du phosphore et de l'azote dans le précipité de phytate de protéine .

$$Nb = \frac{10^5}{31 \times 6,25} \times \frac{P}{N} = \frac{518 P}{N}$$

Pour la rédaction de ce travail nous avons préféré utiliser un autre mode d'expression "l'indice de combinaison phytique". C'est le nombre d'atome-grammes de phosphore phytique combiné à 100 atome-grammes d'azote protéique dans le précipité de phytate de protéine.

$$\text{Indice de combinaison phytique (Icp)} = \frac{1 \ 400 \ P}{31 \ N} = 45,2 \frac{P}{N}$$

Du point de vue numérique cet indice correspond au Nb à un coefficient près. Sa définition est totalement indépendante du poids moléculaire de la protéine étudiée ainsi que de sa teneur en azote. Elle présente en outre l'avantage de ne pas préjuger du mode de combinaison entre l'acide phytique et les protéines.

Pour comparer nos résultats à ceux des travaux antérieurs nous utilisons les équations suivantes :

$$Icp = 0,087 Nb \quad \text{et} \quad Nb = 11,5 Icp$$

On arrondit ces deux indices au troisième chiffre significatif.

- TROISIEME CHAPITRE -

ETUDE DE L'INFLUENCE DE DIVERS PARAMETRES SUR LA
PRECIPITATION PHYTIQUES DES PROTEINES.

Dans ce chapitre nous avons cherché à préciser dans quelle mesure les différents facteurs peuvent influencer la précipitation des protéines par l'acide phytique. Nous nous sommes attaché à mettre en évidence les causes d'inhibition partielle ou totale du phénomène de précipitation. Chaque fois que le précipité pouvait être séparé nous avons effectué une mesure de l'indice de combinaison phytique afin de déceler les conditions pour lesquelles la réaction entre l'acide phytique et les protéines était incomplète tout en étant suffisante pour assurer la précipitation de la protéine.

I. - INTRODUCTION.

Tant par nos résultats personnels que par la lecture des travaux antérieurs, il est évident que ce problème est très complexe. L'évolution d'un paramètre entraîne des modifications de l'influence de certains autres facteurs Ceci est particulièrement évident dans les conditions défavorables pour lesquelles la précipitation phytique des protéines est incomplète.

Il nous semble donc préférable de définir d'abord les conditions de précipitation que nous considérons comme optimales, pour l'étude analytique du précipité de phytate de protéine.

Dans tout ce chapitre nous prendrons comme base les conditions expérimentales suivantes :

- Protéine : 0,50 à 0,66 mg/ml.
- pH : 2 à 2,3.
- acide phytique : 0,006 N.
- acide citrique : 0,04 M..

Toutes les concentrations sont rapportées au milieu réactionnel final. La force ionique en chlorure de sodium est la plus faible possible pour assurer la mise en solution de la protéine étudiée.

Dans la majorité de nos expériences nous avons été obligés de maintenir un pH constant à l'aide d'une solution tampon citrique. Avant toute chose il nous faut donc établir que l'acide citrique ne modifie pas fondamentalement le phénomène que nous étudions.

II. - INFLUENCE DE L'ACIDE CITRIQUE SUR LA PRECIPITATION DES PROTEINES PAR L'ACIDE PHYTIQUE.

Grâce au dispositif que nous décrivons par ailleurs (voir partie technique : chapitre III. B et III C - 2) nous faisons varier la teneur en acide citrique du milieu, tous les autres paramètres restant constants.

a- Serum albumine humaine (M. 22)

Nous obtenons une précipitation phytique convenable à partir d'une concentration de 0,025 M. en acide citrique. Pour des concentrations plus faibles le pouvoir tampon du réactif est insuffisant pour assurer le maintien du pH entre 2 et 2,5. Entre 0,025 et 0,1 M. en acide citrique, l'Icp. est maximum (soit 14). Au-delà de 0,1 M. les mesures de l'indice de combinaison phytique sont beaucoup plus imprécises.

b- Gamma-globulines placentaires (M. 9)

De 0 à 0,12 M en acide citrique l'Icp. évolue de 9,4 à 10,6 (soit $10 \pm 0,6$). Pour une concentration plus élevée en acide citrique (0,12 à 0,14 M) cet indice tend à diminuer faiblement (moyenne de $9,5 \pm 0,5$). Pour l'ensemble de cette expérience tous les Icp. se regroupent entre $9,8 \pm 0,8$ alors que les concentrations en acide citrique varient de 0 à 0,14 M. Dans le cas particulier des gamma-globulines placentaires on peut admettre que l'acide citrique n'intervient pratiquement pas dans la précipitation phytique si ce n'est qu'en maintenant le pH inférieur à 2,5.

c- Insuline (M. 10).

Nous avons obtenu des indices de combinaison phytique de $10,8 \pm 0,8$ pour des concentrations en acide citrique variant de 0 à 0,15 M. Dans ce cas encore, l'acide citrique ne modifie pas le phénomène.

d- Protéines du sérum humain :

Dans les mêmes conditions que précédemment les Icp du précipité de phytate de protéine est de $10 \pm 0,6$ pour des variations de concentration en acide citrique de 0 à 0,1 M.

- CONCLUSIONS.

Nous pouvons donc conclure que l'acide citrique utilisé pour son pouvoir tampon ne modifie généralement pas la précipitation phytique des protéines pour des concentrations inférieures à 0,15 M. L'expérience nous a montré qu'avec nos conditions expérimentales le pH du milieu réactionnel peut être maintenu inférieur à 2,5 avec une concentration en acide citrique, de l'ordre de 0,04 M. Nous sommes donc certain de n'introduire aucune erreur en tamponnant nos milieux de réaction par l'acide citrique. Lorsque nous aurons étudié l'influence des autres paramètres de la réaction nous verrons dans quelle mesure la présence d'acide citrique peut atténuer les effets de certains de ces facteurs.

III. - INFLUENCE DU pH SUR LA PRECIPITATION DES PROTEINES PAR L'ACIDE PHYTIQUE.

1- Introduction :

Dès les premières recherches, il est apparu que le pH du milieu réactionnel jouait un rôle important dans la combinaison des protéines avec l'acide phytique. BARRE (100, 101, 102) le prouve pour l'amando-albumine et l'insuline. WORMSER (103) montre que la sérumalbumine humaine est précipitée par l'acide phytique entre pH 4,7 et 2,05. La teneur en phosphore du précipité est maximale entre pH 3 et 2,05 ($r = 166 \pm 3$ soit un Icp. de $14,5 \pm 0,3$). De pH 3 à 4,7 la teneur en phosphore du précipité diminue progressivement : à pH 4,7 $r = 93,5$ (soit Icp = 8,1).

BARRE (104-105) et LABAT (106) mesurent le pourcentage de protéines du sérum humain précipité par l'acide phytique en fonction du pH. Ils s'attachent surtout à l'étude des faibles concentrations. La précipitation est effective entre pH 1,5 et 4,5. De pH 1,5 à 2 la précipitation est incomplète (de l'ordre de 75 %). De pH 2 à 3 les protéines sériques sont totalement précipitées. Elles ne le sont que partiellement entre pH 3 et 4,5. Avec des solutions plus diluées (0,25 mg/ml. de protéine dans le milieu final) la zone de précipitation optimale est plus restreinte.

2- Résultats personnels :

Nous avons mis au point un dispositif expérimental nous permettant d'étudier d'une façon précise l'influence du pH sur la précipitation phytique (voir partie technique, chapitres III. B et III. C 1). Avec cette technique nous obtenons les résultats que nous allons exposer. Pour faciliter la compréhension nous les schématisons dans le tableau N° 1.

a. Serumalbumine humaine (M. 22)

La précipitation phytique commence à un pH compris entre 1 et 1,15. L'indice de combinaison phytique est de 8. Il augmente progressivement avec le pH pour atteindre 14,6 à pH 1,35. De pH 1,35 à 2,75 l'Icp. reste constant à 14,6. Il diminue ensuite progressivement (Icp. = 12,5 de pH 2,75 à 3,9). Au-delà de pH 4,3 l'indice de combinaison phytique diminue très rapidement. A pH 4,3 la précipitation est lente et incomplète avec un Icp. inférieur à 6. Nous avons pu isoler certains précipités à très faibles teneurs en acide phytique (Icp. = 3,4).

b- Gamma-globulines placentaires (M. 9)

La précipitation phytique débute entre pH 1,7 et 1,9. L'indice de combinaison phytique est d'emblée maximum et

reste constant (Icp. = 10,3) jusqu'à pH 2,6. Il diminue légèrement entre 2,6 et 3,6 (Icp. = 8,5). Au-delà de pH 3,6 la précipitation est lente et incomplète avec un Icp de 7,2. Au-delà de pH 4,15 il n'y a plus de précipitation.

c- Proteines du serum humain :

La précipitation phytique commence entre pH 1,2 et 1,6 selon les cas. En général on obtient un indice de combinaison phytique maximum entre pH 2 et 2,6 (Icp. = 13). Il nous faut signaler que, dans trois expériences, nous avons pu mettre en évidence une zone très étroite de pH (entre 1,8 et 2) pour laquelle l'indice de combinaison phytique est anormalement élevé (Icp. de 15 à 18).

Entre pH 2,6 et 3,9 l'Icp. diminue régulièrement. Les derniers précipités isolables entre pH 3,5 et 3,9 donnent des indices de combinaison phytique compris entre 6,5 et 8. Dans quelques rares cas nous avons pu mettre en évidence des précipitations faibles et incomplètes jusqu'à pH 4,5 alors que pour la majorité des sérums la précipitation est nulle au-delà de pH 4.

CONCLUSIONS.

Les pH limites de précipitation phytique varient d'une protéine à l'autre. La sérum-albumine précipite entre pH 1,15 et 4,3 alors que les gamma-globulines restent dans le surnageant en dessous de pH 1,7 et au-dessus de pH 4,15. On peut le plus souvent mettre en évidence une zone de pH pour laquelle il y a un indice de combinaison phytique maximum. La largeur de cette zone diffère selon la protéine étudiée (pH 1,35 à 2,75 pour la sérumalbumine humaine ; pH 1,7 à 2,6 pour les gamma-globulines).

Pour des mélanges de protéines comme le sérum sanguin les limites diffèrent en fonction de la composition du milieu. Nous cherchons plus loin à mieux préciser la composition du liquide surnageant dans les zones de pH de précipitation incomplète.

Il faut séparer deux phénomènes :

- Premier phénomène : la précipitation phytique se produit dans une zone assez large de pH (pH 1,1 à 4,3 pour la sérum-albumine de pH 1,7 à 3,6 pour les gamma-globulines). Ces limites de précipitabilité sont variables d'une protéine à l'autre.
- Deuxième phénomène : La combinaison de l'acide phytique avec la protéine précipitée n'est optimale que dans une zone de pH très étroite ($2,05 \pm 0,7$ pour la sérum-albumine humaine, $2,2 \pm 0,4$ pour les gamma-globulines placentaires).

Les différences de comportement enregistrées d'une protéine à l'autre sont toutefois assez faibles. De plus nous avons constaté que la largeur des zones de précipitation varie en fonction de la concentration en protéine. Ceci a d'ailleurs déjà été signalé par LABAT (107). Il semble donc difficile d'envisager l'utilisation de ces différences de précipitabilité pour le fractionnement des protéines.

pH du milieu	sérumalbumine (Icp.)	Gamma-globulines (Icp.)	pH du milieu
Inférieur à 1	pas de précipitation	pas de précipitation	Inférieur à 1
1,2	8	Pas de précipitation	1,2
1,4	14		1,4
1,6	14,6		1,6
1,8	14,6		1,8
2 à 2,6	14,6	10,3	2,0 à 2,6
2,8 à 3,8	diminution progressive jusqu'à 12,5	diminution progressive jusqu'à 8,5	2,8 à 3,6
4,0	diminution rapide.	précipitation lente et incomplète (7,2)	3,8 à 4,0
4,2	inférieur à 6	pas de précipitation.	au-delà de 4,2
4,4	précipitation lente et incomplète		
4,6	Pas de précipitation.		

Tableau N° 1 : Influence du pH sur la précipitation phytique et sur l'indice de combinaison phytique (Icp.) de la sérumalbumine humaine et des gamma-globulines placentaires

(acide phytique : 0,006 N - acide citrique : 0,04 M - protéine : 0,5 mg/ml).



**IV. - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ACIDE PHYTIQUE
SUR LA PRECIPITATION DES PROTEINES PAR L'ACIDE
INOSITOHÉXAPHOSPHORIQUE.**

1. Introduction :

LABAT (108) montre que, pour de faibles dilutions de sérum, les concentrations en acide phytique de 0,006 à 0,030 M permettent la précipitation des protéines. WORMSER (109) étudie l'influence de la concentration en acide phytique sur la combinaison de l'acide inositohexaphosphorique (I.H.P.) avec la sérumalbumine humaine les résultats lui permettent de mieux préciser le mode de combinaison I.H.P.-sérumalbumine et de différencier une zone de concentration pour laquelle la réaction suit la loi d'action de masse. La plupart des auteurs ont utilisé pour leurs travaux une concentration en acide phytique telle que le rapport pondéral phosphore phytique / azote protéique du milieu soit voisin de 3. Comme le montre LABAT, un rapport de 1 donne encore des résultats convenables.

2. Résultats personnels :

Pour cette étude nous faisons varier la concentration en acide phytique dans le milieu réactionnel. Le phosphore phytique est dosé dans le réactif avant le mélange à la solution de protéines. On peut en déduire la concentration effective en acide phytique dans le milieu réactionnel (partie technique : chapitre III C 3) : on dose par ailleurs le phosphore phytique dans le liquide surnageant après centrifugation (partie technique : chapitre II. F.). Comme pour la mesure de l'indice de combinaison phytique on est amené à doser le phosphore du précipité de phytate de protéine (partie technique : chapitre I. b). Il nous est possible d'étudier le phénomène en contrôlant tous les éléments de la réaction.

a- sérumalbumine humaine (M. 22):

A pH 2,10 une solution de sérumalbumine humaine précipite en présence d'acide phytique 0,0015 N. Les indices de combinaison phytique n'atteignent leur valeur optimale que pour des concentrations en acide phytique de l'ordre de 0,006 N. Le tableau N° II. montre que pour de faibles concentrations en acide phytique (0,0015 N) la précipitation de la sérum-albumine humaine est complète en présence d'acide phytique 0,05 M. (indice de combinaison phytique de 9,5). En présence d'acide phytique 0,0045 N cet indice atteint sa valeur optimale si l'on est en présence de tampon citrique 0,05 M. L'Icp. n'est que de 12,4 en son absence. L'acide citrique favorise donc indiscutablement la précipitation phytique de la sérum-albumine pour les faibles concentrations en acide phytique.

Par contre en solution citrique 0,15 M l'indice de combinaison phytique tend à diminuer : par exemple il n'est plus que de 12,6 même en présence d'acide phytique 0,006 N.

b- Gamma-globulines placentaires (M. 9):

A pH 2,10 les gamma-globulines placentaires donnent un précipité faible en présence d'acide phytique 0,001 N. Le tableau N° III. montre que la présence d'acide citrique améliore les indices de combinaison phytique pour les faibles concentrations en acide phytique. Ce phénomène est toutefois beaucoup moins marqué que dans le cas de la sérumalbumine. De plus, en présence d'acide citrique 0,15 M. l'indice de combinaison phytique est toujours voisin de 9,6. Les fortes concentrations en acide citrique n'entraînent pas dans les cas des gamma-globulines une diminution de la teneur en phosphore phytique du précipité.

Donc, pour les gamma-globulines les concentrations minimales en acide phytique pour obtenir une bonne précipitation et un Icp. optimum sont plus faibles que dans le cas de la sérumalbumine.

Acide phytique	0,001 N	0,0015 N	0,003 N	0,0045 N	0,006 N
Acide citrique 0	précipit. nulle	précipit. nulle	12,9 ⁺	12,4 ⁺	13,3 ⁺
0,01 M	précipit. faible	précipit. faible	11,5 ⁺	13,3 ⁺	13,8 ⁺
0,05 M	Précipit. partielle (9,5)	9,9 ⁺	11,3 ⁺	13,3 ⁺	13,3 ⁺
concentration en acide phytique du liquide surnageant	inférieure à 0,0002N	Inférieure à 0,0002N	0,001 N	0,0025 N	0,004 N
Rapport :					
<u>Eq. acide phytique</u> Eq. azote protéique	0,13	0,2	0,4	0,6	0,8
Rapport pondéral :					
<u>P. Phytique</u> N. protéique.	0,15	0,22	0,44	0,66	0,88

Tableau II. Indice de combinaison phytique (les chiffres marqués d'un +) de la sérumalbumine humaine (M.22) en fonction de la concentration du milieu en acide phytique et en acide citrique (pH 2,10 - Protéine 0,66 mg./ml.

Pour chacune des conditions expérimentales, nous faisons figurer à la partie inférieure du tableau, les concentrations en acide phytique du liquide surnageant après la précipitation et les rapports phosphore/azote dans le milieu de la réaction.



Acide phytique.	0,0015 N	0,003 N	0,0045 N	0,006 N
Acide citrique 0	7,7 ⁺	8,4 ⁺	9,2 ⁺	9,6 ⁺
0,01 M	8,4 ⁺	9,2 ⁺	9,5 ⁺	9,3 ⁺
0,05 M	8,8 ⁺	9,6 ⁺	9,8 ⁺	9,6 ⁺
Concentration en acide phytique du surnageant	0,0003 N	0,0015 N	0,003 N	0,0045
Rapport :				
<u>Eq. Acide phytique</u>	0,2	0,4	0,6	0,8
Eq. Azote protéique				
Rapport pondéral :				
<u>Phosphore phytique</u>	0,22	0,44	0,66	0,88
Azote protéique				

Tableau III. - Indice de combinaison phytique (les chiffres marqués d'un des gamma-globulines placentaires (M. 9) en fonction de la concentration du milieu en acide phytique et en acide citrique (pH 2,10 - protéines 0,66 mg/ml.)

Pour chacune des conditions expérimentales nous faisons figurer à la partie inférieure du tableau, les concentrations en acide phytique du liquide surnageant après la précipitation et les rapports phosphore / azote dans le milieu de réaction.



c- Protéines du sérum-humain :

Avec plusieurs dilutions de sérum humain nous avons obtenu un début de précipitation en présence d'acide phytique de 0,001 à 0,0015 N. Les résultats varient d'un sérum à l'autre. Pour les concentrations inférieures à 0,004 N en acide phytique on trouve le plus souvent des indices de combinaison phytique faibles (inférieures à 10).

CONCLUSIONS :

Pour une concentration en protéine de 0,5 à 0,7 mg/ml l'acide phytique 0,0045 N assure une précipitation totale et un indice de combinaison phytique optimum pour des protéines aussi différentes que la sérumalbumine et les gamma-globulines. Les gamma-globulines précipitent pour des concentrations très faibles en acide phytique (0,001 à 0,015 N) alors que dans les mêmes conditions la sérum-albumine ne précipite pas ou ne précipite que partiellement.

Par contre, toujours dans les mêmes conditions mais en présence d'acide citrique, la précipitation de la sérumalbumine est plus complète. Dans les zones de concentration en acide phytique donnant des précipitations partielles et des indices de combinaison phytique faibles, la présence d'acide citrique tend à favoriser la précipitation et à normaliser les Icp. Ce phénomène est plus marqué en présence d'acide citrique 0,05 M que dans le cas d'un tampon 0,01 M. Toutefois au-delà de 0,1 M en acide citrique et surtout à partir de 0,15 M. les indices de combinaisons phytique tendent à s'abaisser. Dans tous les cas les meilleurs résultats sont obtenus en présence de tampon citrique voisin de 0,05 M.

L'étude de la concentration en acide phytique du liquide surnageant montre qu'en l'absence de tampon citrique, il faut, pour obtenir une précipitation optimale, un excès d'acide phytique tel qu'il reste après précipitation totale de la protéine une solution 0,002 à 0,003 N d'acide phytique. L'acide citrique favorise la réaction à tel point que pour un surnageant correspondant à moins de 0,0002 N d'acide phytique la précipitation de la sérumalbumine est certes partielle mais l'indice de combinaison phytique est voisin de 75 p. 100 de l'optimum (voir tableaux N° II et III).

Pour les concentrations en protéines que nous avons choisies (0,5 à 0,7 mg/ml.) la précipitation est optimale pour un rapport équivalent acide phytique / équivalent d'azote protéique supérieur ou égal à 0,66.

Enfin même si les gamma-globulines précipitent pour une concentration plus faible en acide phytique, il ne semble pas que le phénomène soit suffisamment marqué pour envisager une application préparative.

V.- INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE ET DES CATIONS MONOVALENTS SUR LA PRECIPITATION DES PROTEINES PAR L'ACIDE PHYTIQUE.

A. INTRODUCTION.

LABAT (110) étudie l'influence de la force ionique en chlorure de sodium sur la précipitation phytique des protéines sériques et de la sérumalbumine. Elle montre que pour une certaine concentration en chlorure de sodium la

précipitation de protéine par l'acide phytique est inhibée ; nous résumons ces résultats tableau N° IV. Il faut remarquer que la précipitation reprend pour des concentrations de chlorure de sodium de l'ordre de 1 M. Le phénomène est plus évident si les concentrations en protéine dans le milieu sont plus faibles. Il nous a semblé intéressant de poursuivre cette étude et de la généraliser aux autres cations monovalents.

B. RESULTATS PERSONNELS.

Avec les circuits d'analyse continue que nous décrivons par ailleurs (partie technique : chapitres III. B et III. C 4) il nous a été possible de faire varier très progressivement la concentration en chlorure de cation monovalent du milieu réactionnel et à chaque stade, soit de mesurer l'indice de combinaison phytique du précipité, soit de constater l'inhibition de la précipitation.

I. Inhibition de la précipitation phytique par les cations monovalents.

Le tableau N° V donne les concentrations pour lesquelles divers cations monovalents inhibent la précipitation phytique. On remarquera que pour la sérumalbumine (M. 22) les cations monovalents inhibent la précipitation phytique pour une force ionique identique quelque soit le cation envisagé. En milieu tamponné par l'acide citrique la précipitation est inhibée pour des concentrations sensiblement plus faibles.

Pour les gamma-globulines placentaires (M. 9) l'inhibition de la réaction est obtenue pour des forces ioniques beaucoup plus faibles et encore une fois tous les cations agissent d'une façon assez comparable.

sérumalbumine (concentration mg/ml du milieu)	2,5	1,25	0,25
Inhibition entre	0,251 et 0,751	0,188 et 0,648	0,109 et 0,598
Reprise entre	0,949 et 1,295	0,881 et 1,702	1,173 et 1,756
Protéines sériques (concentrations approximatives mg/ml).	3,5	1,75	0,35
Inhibition entre	0,258 et 0,724	0,186 et 0,651	0,130 et 0,598
Reprise entre	0,724 et 0,956	0,854 et 1,130	0,828 et 1,170

Tableau N° IV : Forces ioniques en chlorure de sodium inhibants la précipitation phytique.
Forces ioniques pour lesquelles la précipitation reprend (LABAT III.)



	sérumalbumine humaine		gamma-globulines placent.	
	acide citrique	0	0,042 M	0
Na ⁺	0,28	0,20	0,10	0,11
K ⁺	0,28	0,21	0,09	0,11
Li ⁺	0,28	0,20	0,10	0,10
NH ₄ ⁺	0,25 à 0,5	0,20	0,08 à 0,16	0,10



Tableau V. - Forces ioniques en cation monovalent (Na⁺, K⁺, Li⁺ NH₄⁺ inhibitrices de la précipitation phytique de la sérumalbumine humaine (M 22) et des gamma-globulines placentaires (M 9) en présence d'acide citrique 0,042 M et en milieu non tamponné (pH 2,10 acide phytique 0,006 N, protéine : 0,5 mg/ml)

L'acide citrique 0,042 M n'apporte pas de modifications significatives. L'ammoniaque donne dans l'ensemble des résultats beaucoup moins bien définis que les autres cations. Sur une assez large zone de force ionique il se forme un louche plus ou moins intense difficile à séparer du liquide surnageant.

Ces résultats nous permettent de dégager dès maintenant plusieurs conclusions :

- les cations monovalents inhibent la précipitation phytique d'une protéine pour une force ionique identique quelque soit le cation.

- cette concentration inhibitrice peut avec certaines protéines être modifiée par la présence d'acide citrique mais le phénomène n'est pas général.

- l'inhibition de la précipitation phytique par les cations monovalents est très variable d'une protéine à l'autre. On peut donc espérer fractionner, au moins partiellement, un mélange de protéines en opérant une précipitation phytique en présence d'une concentration en ion sodium convenablement choisie.

- en solution isotonique c'est-à-dire de l'ordre de 0,15 Eq./l. les gamma-globulines resteront en solution alors que la sérumalbumine sera précipitée. Nous verrons dans les chapitres suivants que dans certains cas où la force ionique est trop élevée on retrouve des gamma-globulines dans les liquides surnageants après précipitation phytique.

- Pour l'étude des mélanges de protéines obtenues par relargage par le sulfate d'ammonium il nous faudra dialyser très soigneusement les préparations afin d'éliminer la majeure partie de ce sel.

2. Influence de la force ionique en cations monovalents sur l'indice de combinaison phytique.

Nous résumons tableaux N° VI, VII, VIII et IX les résultats de plusieurs séries de mesures exécutées avec plusieurs conditions expérimentales différentes entre elles.

D'une manière assez générale on constate que les cations monovalents ont tendance à faire diminuer l'indice de combinaison phytique des protéines. Ceci est d'ailleurs assez variable selon les cations et selon les protéines:

a- sérumalbumine humaine (M. 22) :

En l'absence d'acide citrique, mais à pH maintenu manuellement à 2,10, l'indice de combinaison phytique de la sérumalbumine humaine diminue progressivement lorsque la force ionique en sodium augmente. Le tableau N° VII. montre que cette diminution est d'abord assez faible ($I_{cp} = 13,1$ pour 0,042 Eq./l. de sodium.) Elle devient sensible au-delà de 0,06 Eq./l. de sodium ($I_{cp} = 12,3$ pour 0,083 Eq. de sodium/l.) et surtout 0,166 Eq. de sodium/l. ($I_{cp} = 10$).

Dans les mêmes conditions mais en présence de tampon citrique 0,042 M. les diminutions de l'indice de combinaison phytique en fonction de la force ionique en sodium sont légèrement plus marquées. Les variations sont déjà sensibles pour 0,042 Eq. de sodium/l. ($I_{cp} = 11,7$ en milieu citrique au lieu de 13,1 en milieu non tamponné). Si la concentration en protéine du milieu est légèrement plus faible (0,5 au lieu de 0,66 mg./ml.) l'influence de l'ion sodium est moins importante et les diminutions de l'indice de combinaison phytique plus lentes à se manifester ($I_{cp} = 13,5$ pour 0,083 Eq. de sodium/l. et $I_{cp} = 11,7$ pour 0,166 Eq. de sodium/l.)

	acide citrique	conditions expériment	sérum- albumine humaine.	Gamma-globulines placentaires
Voisin	0	B	14	9,6
	0,042M	B	14	9,6
0,042	0	B	13,1	8,5
	0,042 M	A	13,5	7,3
	0,042 M	B	11,7	8,8
0,083	0	B	12,3	précipit. partielle
	0,042 M	A	11,1	précipit. partielle 5,2
	0,042 M	B	13,5	précipit. partielle 5,5
0,166	0	B	10	pas précipitation
	0,042 M	A	11,7	pas précipitation

Tableau N° VI. Indice de combinaison phytique de la sérumalbumine humaine (M 22) et des gamma-globulines placentaires (M 9) en présence de concentrations variables en ions sodium et en acide citrique.

Conditions expérimentales A : avec un dispositif de gradient en Na⁺
(partie technique : chapitre III. B)
acide phytique : 0,006 N
protéine : 0,5 mg/ml
acide citrique : 0,042 M

Conditions expérimentales B : manuellement.

acide citrique : 0,006 N
protéine : 0,66 mg/ml



Li ⁺ Eq./l.	Acide citrique	conditions expérimentales	sérumalbumine humaine	Gamma-globulines placentaires
0	0	B	14	9,6
	0,042 M	A	14	9,6
0,042	0	B	12,9	7,9
	0,042 M	A	13	10
0,066	0	B	12	7,8
	0,042 M	A	13	9
0,166	0	B	8	pas de précipit.
	0,042 M	A	11,5	pas de précipit.

Tableau N° VII : INDICE DE COMBINAISON phytique de la sérumalbumine humaine et des gamma-globulines placentaires en présence de concentrations variables en ion LITHIUM et en acide citrique.

- Conditions expérimentales A : avec un dispositif de gradient en Li⁺ (partie technique chapitre III B.)
 - acide phytique : 0,006 N
 - protéine : 0,5 mg/ml
 - acide citrique : 0,042 M
- Conditions expérimentales B : manuellement.
 - acide phytique : 0,006 N
 - protéine : 0,066 mg/ml

K ⁺ Eq./l.	Acide citrique	conditions expérimentales	sérumalbu- mine humaine	Gamma-globulines placentaires
0	0	B	14	9,6
0	0,042 M	A	14	9,6
0,042	0	B	12,2	7,7
	0,042 M	A	11,8	9,5
0,083	0	B	11,9	précipit. partielle
	0,042 M	A	10,5	8
0,166	0	B	10,6	pas de préci- pitation.
	0,042 M	A	10	pas de préci- pitation.

Tableau VIII : Indice de combinaison phytique de la serumal-
bumine (M. 22) et des gamma-globulines placentaires
(M 9) en présence de concentrations variables en
POTASSIUM et en acide citrique.

- Conditions expérimentales A : avec un dispositif de gradient en K⁺
(partie technique : chapitre III. B)

- acide phytique = 0,006 N
- protéine = 0,5 mg/ml
- acide citrique = 0,042 M

- Conditions expérimentales B : manuellement.

- acide phytique = 0,006 N
- protéine = 0,66 mg/ml

NH ₄ ⁺ Eq./l.	Sérumalbumine humaine.	Gamma-globulines Placentaires.
0	14	9,6
0,042	12,5	8,9
0,083	12	6,6
0,166	11,2	pas de précipitation



Tableau IX. Indice de combinaison phytique de la sérumalbumine humaine (M 22) et des gamma-globulines placentaires (M 9) en présence de concentration variable en AMMONIUM.

Acide phytique : 0,006 N
 Acide citrique : 0,042 M
 Protéine : 0,5 mg/ml.

Avec les ions lithium (tableau VII) ; potassium (tableau VIII) et ammonium (tableau IX) les variations de l'indice de combinaison phytique sont très comparables mais les diminutions sont un peu plus importantes.

b- gamma-globulines placentaires (M. 9)

Les indices de combinaison phytique diminuent très rapidement lorsque la force ionique en cation monovalent augmente (voir tableaux N° VI. - VII. - VIII. et IX.). Comme nous l'avons vu au chapitre précédent les cations monovalents inhibent la précipitation phytique pour une concentration de 0,1 Eq./l. A partir de 0,08 Eq./l. Les précipitations ne sont que partielles et irrégulières. En règle générale l'acide citrique favorise la précipitation et atténue la diminution de l'indice de combinaison phytique provoquée par la présence de cations alcalins.

CONCLUSIONS :

Lors d'une précipitation analytique de protéines il faut chercher à limiter au strict minimum la force ionique en cations monovalents (le sodium m le plus souvent).

Lorsqu'on opère avec un réactif précipitant préparé par acidification du phytate de sodium (R. 1) la force ionique en sodium du milieu réactionnel est au minimum de 0,006 Eq./l. La prise d'essai représente un apport de sodium de l'ordre de 0,002 à 0,003 Eq./l. Donc, avec la technique que nous proposons (partie technique : chapitre I) la force ionique du milieu est inférieure à 0,01 Eq./l. de sodium et à cette concentration il ne semble pas y avoir de risques d'erreurs par défaut. Il est toutefois préférable d'opérer avec une solution d'acide phytique (R. 2). Le sodium a été éliminé de ce réactif par passage sur un échangeur de cation (DOWEX 50).

VI. - INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT.

Dans une zone de concentration convenable la précipitation est rapide. Après une demi-heure le précipité est sédimenté et le liquide surnageant limpide. On peut le plus souvent centrifuger après une heure de repos. Des mesures effectuées après une heure, sept heures et 22 heures de temps de contact ont donné des résultats identiques. Même ^{pour} des solutions de protéines très diluées il est souvent inutile d'attendre plus de deux heures avant de centrifuger.

Dans certaines conditions défavorables la précipitation est lente, parfois incomplète en 24 heures; l'indice de combinaison phytique semble indépendant de la vitesse de précipitation.

VII. - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

Le plus souvent la précipitation est effectuée à 4°C. Entre 4°C et 20°C les fixations ne semblent pas dépendre de la température. Lors des précipitations préparatives nous préférons opérer à la température du laboratoire avec des réactifs réfrigérés à 4°C de façon à limiter les phénomènes de dénaturation. Notons qu'une suspension de phytate de protéine dans une solution diluée d'acide phytique peut être maintenue à 37°C plusieurs jours sans aucune modification de son aspect macroscopique. Cette même suspension chauffée progressivement coagule sans qu'il ait à aucun moment solubilisation de la combinaison.

VIII. - RECAPITULATION DU ROLE DE L'ACIDE CITRIQUE
UTILISE COMME TAMPON LORS DE LA PRECIPITATION
PHYTIQUE DANS UN BUT ANALYTIQUE.

Nous avons vu au cours de ce chapitre que de fortes concentrations en acide citrique amenaient certaines perturbations dans la mesure de l'indice de combinaison phytique. Si tous les autres paramètres sont choisis de façon à obtenir un indice de combinaison phytique optimum, l'influence de l'acide citrique est négligeable si sa concentration est inférieure à 0,1 M. Au-delà, de cette concentration, les mesures de l'indice de combinaison phytique de la sérumalbumine humaine donnent des résultats assez irréguliers. Cette perturbation est peu évidente avec les gamma-globulines placentaires. Elle est nulle pour l'insuline. Donc, lors d'une précipitation phytique analytique l'acide citrique à une concentration modérée ne gêne aucunement la mesure de l'indice de combinaison phytique.

Dans des conditions défavorables la présence d'acide citrique peut modifier la mesure de l'indice de combinaison phytique. Par exemple, si l'acide phytique n'est pas à une concentration suffisante pour saturer la protéine et assurer la précipitation totale, la présence d'acide citrique favorise la combinaison. Avec la sérumalbumine la teneur en acide phytique du liquide surnageant est beaucoup plus faible en présence de tampon citrique qu'en milieu non tamponné. Dans ce cas, la présence d'acide citrique favorise la formation de phytate de protéine.

Par contre, l'inhibition de la précipitation phytique de la sérumalbumine par les cations monovalents est favorisée par la présence d'acide citrique, alors qu'elle n'est pas influencée dans le cas des gamma-globulines placentaires pourtant plus sensibles à la présence de ces cations.

La diminution de l'indice de combinaison phytique de la sérumalbumine humaine provoquée par les cations monovalents, est plus importante en présence d'acide citrique, surtout si la concentration en protéine est plus élevée. Pour les gamma-globulines cette influence est moins marquée, mais dans la zone de précipitation partielle les indices de combinaison phytique sont un peu plus élevés en présence d'acide citrique.

CONCLUSIONS :

La sérumalbumine humaine est dans l'ensemble beaucoup plus sensible à la présence d'acide citrique que ne le sont les gamma-globulines placentaires. Avec un tampon citrique les effets d'un défaut en acide phytique sont généralement atténués. Au contraire, l'inhibition provoquée par une force ionique élevée en cations monovalents est en général accentuée sauf dans certaines conditions de précipitation partielle des gamma-globulines.

Toutefois, l'action de l'acide citrique ne se manifeste que dans des conditions défavorables de précipitation. Lorsque tous les autres éléments sont convenablement choisis l'acide citrique n'intervient pas dans la réaction.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU TROISIÈME CHAPITRE :

Dans ce chapitre, nous avons établi un ensemble de conditions optimales pour réaliser une précipitation de protéine par l'acide phytique. La concentration en protéines (0,5 à 0,66 mg./ml. est limitée par la sensibilité de nos méthodes de dosage du phosphore du phytate de protéine. Ceci étant fixé, nous avons pu déterminer qu'il fallait un milieu phytique minimum de 0,006 N. Au-delà de 0,01 N l'excès d'acide

phytique du liquide surnageant risque de contaminer le précipité et d'entraîner une cause d'erreur. Enfin, une solution d'acide citrique 0,04 M. est suffisante pour maintenir le milieu à un pH entre 2 et 2,3. Pour la mesure de l'indice de combinaison phytique, il importe de contrôler parfaitement le pH car nous avons établi que dès pH 2,6 il peut apparaître une erreur par défaut.

Pour une précipitation préparative, il est inutile de tamponner le milieu réactionnel, car opérant avec de grands volumes, il est plus facile d'ajuster le pH à l'aide d'un pH-mètre.

La quantité d'acide phytique utilisée doit être telle que le rapport phosphore phytique / azote protéique du milieu se trouve supérieur à 0,60 (les concentrations étant exprimées en Eq./l.)

Enfin, il faut limiter la force ionique en cations monovalents qui peuvent être à l'origine d'inhibitions de certaines précipitations.

- Q U A T R I E M E C H A P I T R E -

=====

PRECIPITATION PHYTIQUE DE FRACTIONS DE PROTEINES
PLASMATIQUES OBTENUES EN ELECTROPHORESE PREPARATIVE.

INTRODUCTION :

Avant de progresser plus avant dans l'étude de la précipitation des protéines par l'acide phytique, nous devons préciser la nature de celles qui sont solubles ou insolubles dans ce réactif.

Pour cela nous soumettons un sérum à un fractionnement par électrophorèse préparative en veine liquide (M. 12) La répartition des fractions est tracée à la fois par le dosage des protéines par la méthode de LOWRY (partie technique : chapitre VI. B) et par le dosage des glucides totaux combinés par la méthode à l'orcinol (partie technique : chapitre VI C) effectués sur chaque tube. Après défécation phytique, les mêmes mesures effectuées sur les surnageants correspondants nous permettent de chiffrer pour chaque fraction le pourcentage de protéines phyto-solubles.

DESCRIPTION DE L'EXPERIENCE :

Un volume de mélange de sérums humains est dilué par deux volumes de tampon tris-hydroxymethyl-amino-méthane (0,08 M) acide citrique (0,008 M) de pH 8,6.

Cette dilution est injectée dans la cuve de l'appareil pour électrophorèse préparative à la vitesse de 2 ml/heure. La veine liquide est garnie avec ce même tampon et est maintenu à une température de 5° C. Le film de liquide se déplace perpendiculairement au sens du courant à une vitesse de 0,5 ml/mn. Le potentiel est maintenu à 2 400 volts sous 160 milliampères pendant toute l'opération (36 heures). (partie technique : chapitre VI. A). Sur les quarante huit tubes obtenus, on effectue les dosages de protéines et de glucides totaux, dont les résultats sont reproduits sur les courbes N° 1 des figures N° 3 et 4.

Un prélèvement de 50 ml de chacun des tubes est acidifié à pH 2,10 par addition goutte à goutte d'une solution normale d'acide chlorhydrique. On ajoute ensuite goutte à goutte une solution normale d'acide phytique jusqu'à précipitation totale. On centrifuge, on vérifie que le surnageant ne précipite plus par l'acide phytique et on lyophilise. La poudre blanche ainsi obtenue est mise en solution dans cinq millilitres d'eau distillée et on dose les protéines et les glucides totaux, ce qui permet de tracer les courbes N° 2 des figures 3 et 4).

Pour chaque tube la différence de concentration en protéines avant et après précipitation phytique donne la quantité de protéines précipitées et nous permet de construire la troisième courbe de ces figures.

CONCLUSIONS :

L'examen de ces résultats nous permet d'effectuer dès maintenant quelques constatations fondamentales.

1- Seule une très faible proportion des protéines du sérum se retrouve dans le liquide surnageant après précipitation par l'acide phytique à pH 2,10.

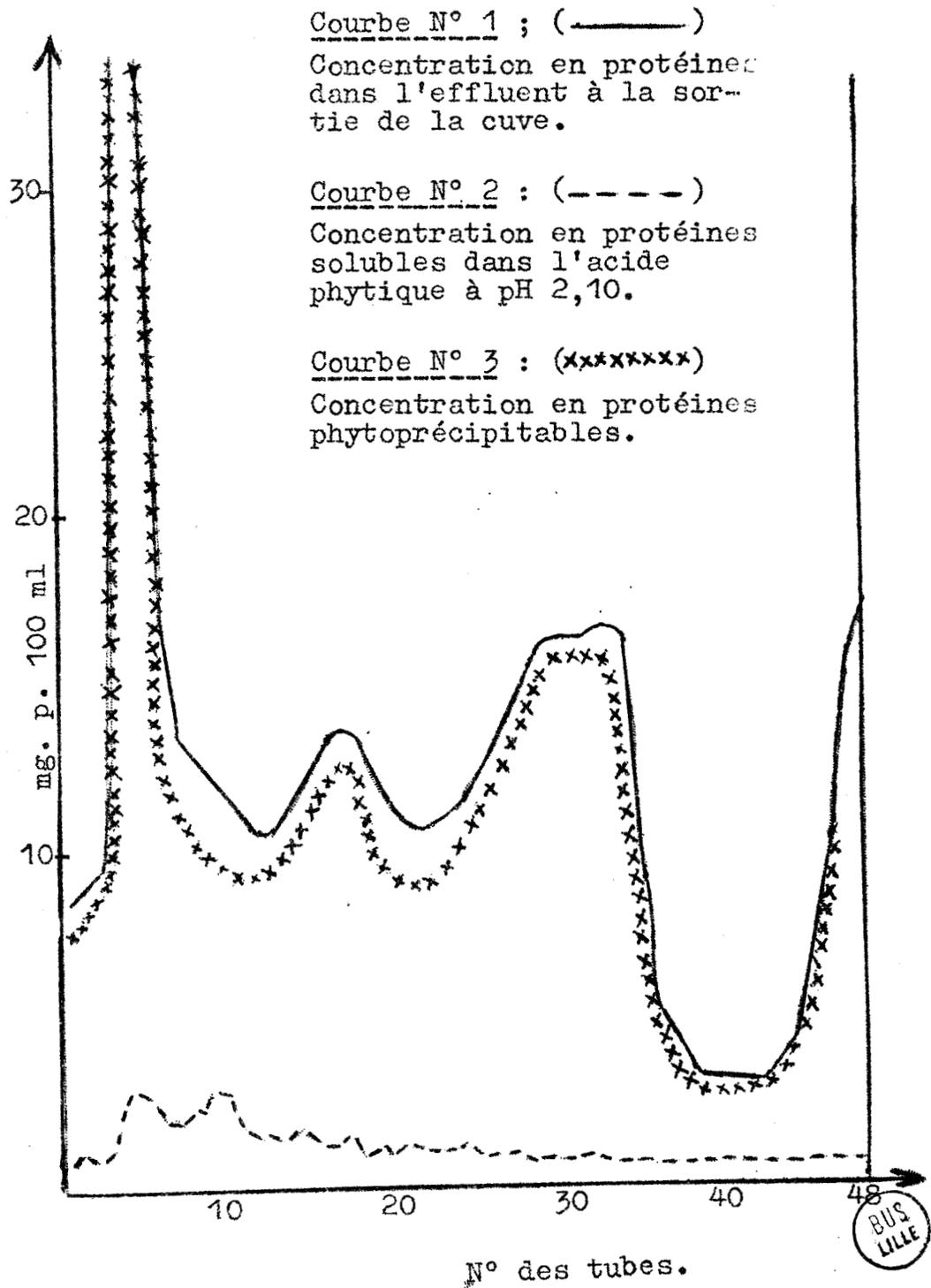


Figure N° 3 : Electrophorèse préparative en veine liquide d'un
 sérum sanguin.

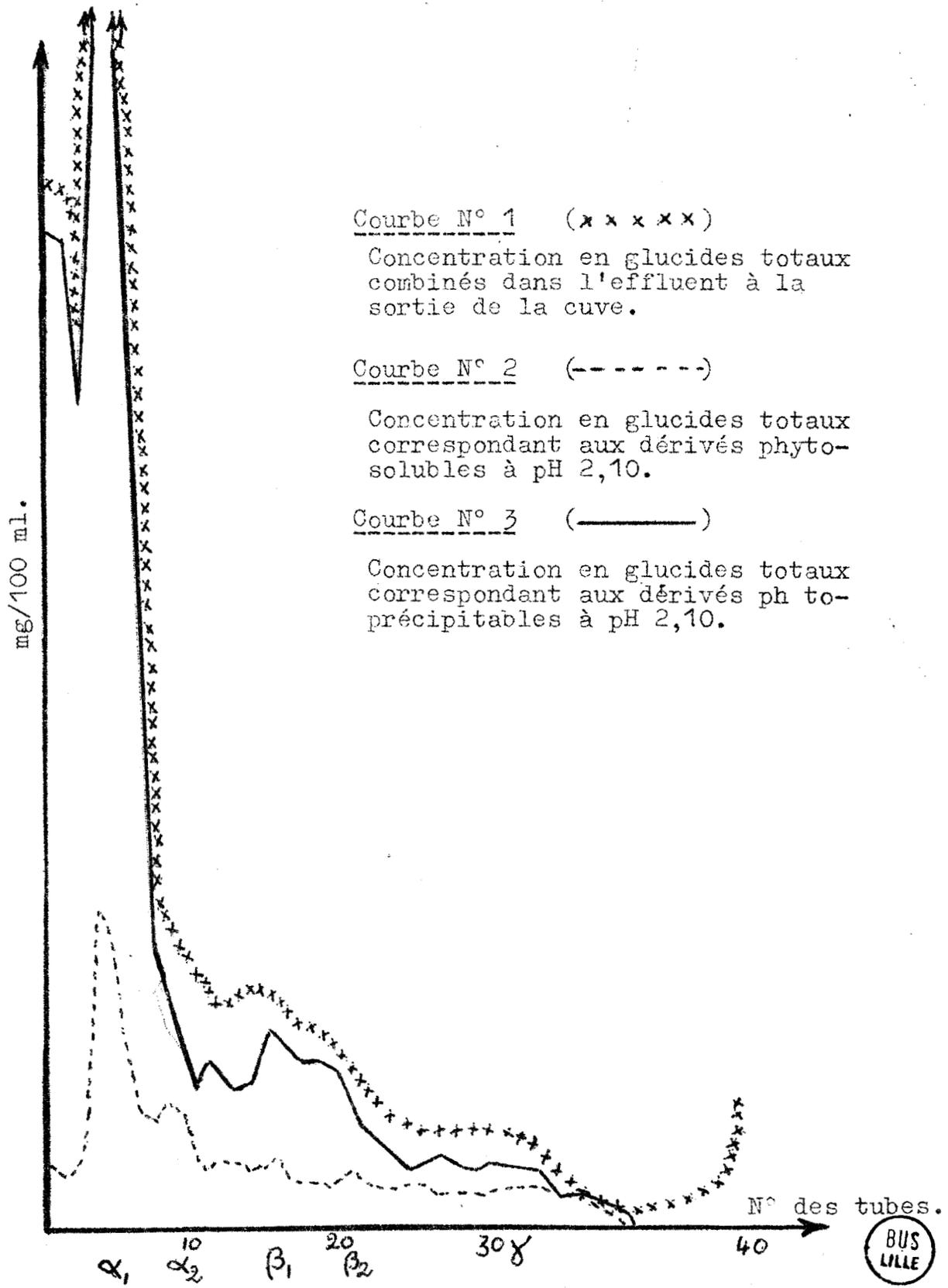


Figure N° 4 : Electrophorèse préparative en veine liquide d'un sérum sanguin.

2- Alors que les protéines du sérum se regroupent assez bien en quelques fractions de mobilité électrophorétique plus ou moins bien définie, la fractions phytosoluble de ces protéines se répartit assez régulièrement tout le long du diagramme.

3- Les protéines solubles dans l'acide phytique sont relativement riches en glucides combinés, ce qui permet dès maintenant d'émettre l'hypothèse que nous sommes en présence de glycoprotéines.

4- Les glycoprotéines du sérum ne sont pas dans leur totalité solubles dans l'acide phytique. Une partie importante se retrouve dans le précipité tout particulièrement dans la zone α_2 et β_1 . Il nous faut donc chercher à identifier les glycoprotéines solubles et insolubles dans l'acide phytique.

5- Cette expérience préliminaire est effectuée sans tenir compte de la concentration en protéine (pour les tubes N° 4, 5 et 6 correspondants à la sérumalbumine la présence d'une forte proportion de protéines précipitables a certainement entraîné une adsorption de protéines phytosolubles sur le précipité.)

- C I N Q U I E M E C H A P I T R E -
 =====

ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU
 SURNAGEANT ET DE L'EXTRAIT PHYTIQUE.

Nous décrivons dans la partie technique les méthodes préparatives que nous utilisons. Dans cette partie expérimentale nous ne donnerons que les principes généraux et les compte-rendus des expériences qui ont permis la mise au point de ces méthodes.

La précipitation phytique est toujours effectuée à pH $2,10 \pm 0,20$ en présence d'un excès d'acide phytique. Le sérum est dilué au dixième de façon à limiter l'adsorption sur le précipité. Après centrifugation, ou filtration, on obtient un liquide limpide ne précipitant pas par addition d'acide phytique. C'est cette solution que nous appelons le SURNAGEANT PHYTIQUE du SERUM.

Le surnageant phytique dialysé à 4° C contre eau distillée, concentré à température inférieure à 40° C et lyophilisé donne l'EXTRAIT PHYTIQUE DU SERUM. Cette terminologie est analogue à celle utilisée par d'autres auteurs pour l'étude des protéines solubles dans les acides perchlorique, trichloracétique et sulfosalicylique.

- Propriétés physico-chimiques du surnageant phytique :

C'est un liquide incolore et fortement aphrogène. Il ne précipite pas par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 20 p. 100 ou d'acide perchlorique 1,2 N. Il reste

limpide lorsque l'on fait varier le pH et ce quelque soit le sens et l'intensité de cette variation. Porté à ébullition à pH 2,10 il ne produit aucune coagulation.

- Propriétés physico-chimiques de l'extrait phytique :

C'est une poudre blanche d'aspect spongieux, très soluble dans l'eau distillée. La solution aqueuse à 1 p. 100 donne un trouble en présence d'acide perchlorique 0,6 N. et d'acide trichloracétique à 2,5 p. 100. Notons au passage l'importance de la concentration en protéines pour la définition de leur solubilité dans ces acides. La solution à 1 p. 100 de l'extrait phytique est précipitée par l'acide phosphotungstique. L'extrait est insoluble dans l'alcool à 90°. Une solution aqueuse à 1 p. 100 de cet extrait précipite lentement par addition de 10 fois son volume d'alcool absolu.

L'étude spectrophotométrique de la solution aqueuse caractérise une bande d'absorption dont le maximum se situe à 2 780 Å. Cet extrait phytique correspond à des glycoprotéines dont l'hydrolyse chlorhydrique libère les glucides combinés. Après hydrolyse de une heure par HCl N, on dose 9 p. 100 d'hexoses (exprimés par rapport à une gamme galactose / mannose : I/I). Deux heures d'hydrolyse par HCl 2 N libère 6 p. 100 d'hexosamine (exprimées par rapport à un témoin de glucosamine). L'acide sulfurique 0,01 N. libère en trente minutes à 80° C 10,1 p. 100 d'acide N. acétyl neuraminique.

CONCLUSIONS :

Les caractères physico-chimiques de l'extrait phytique tendent à confirmer l'hypothèse que nous avons émise au chapitre précédent : il s'agit probablement de glycoprotéines. Le pouvoir biurétogène et l'absorption à 2 780 Å caractérisent la copule peptidique et les restes d'acides aminés aromatiques.

L'importance de la copule glucidique évaluée par le dosage des glucides combinés est à comparer à celle de diverses glycoprotéines (Tableau X.) .

Seule une très faible proportion de l'extrait physique est insoluble dans l'acide perchlorique et dans l'acide trichloracétique. Pour la suite du travail, nous devons donc chercher à identifier certains des composants de ces préparations aux glycoprotéines solubles dans l'acide perchlorique. Certains autres constituants sont à rapprocher des glycoprotéines (α_2 surtout) perchlorosolubles mais précipitées par l'acide trichloracétique.

Avant d'aborder cette identification nous passerons en revue les critères actuellement utilisables pour la caractérisation et la classification des glycoprotéines.

- S I X I E M E C H A P I T R E -

CLASSIFICATION DES GLYCOPROTEINES DU SERUM.

Dès la fin du siècle dernier KRAWKOW (112) MÖRNER (113) et PAVY (114) signalent l'existence d'oses réducteurs libérés par hydrolyse chimique des protéines du sérum précipité par l'alcool, la chaleur ou d'autres agents de défécation. Ces hétéroprotéides reçoivent le nom de glycoprotéines. On sait actuellement qu'ils constituent la quasi-totalité des composants du sérum sanguin, si l'on excepte la sérumalbumine qui constitue pratiquement la seule holoprotéine du sérum, et les lipoprotéines qui contiennent cependant une petite copule glucidique.

Ces glycoprotéines du sérum sont constituées d'oses (galactose et mannose) d'hexosamines (N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine), d'acide N-acétyl neuraminique et de fucose. Ces résidus glucidiques forment des chaînes hétéropolysaccharidiques unies par une liaison stable de covalence aux chaînes polypeptidiques.

L'hétérogénéité des glycoprotéines du sérum n'apparaît nettement qu'en 1940 à la suite des travaux de BLIX, TISELIUS, et SVENSSON (115) ; RIMINGTON (116) et HEWITT (117). Le fractionnement par les solvants organiques, le relargage par les sels neutres, l'électrophorèse de zone sur papier ou en milieux gélifiés et, plus récemment, les méthodes de chromatographie ont confirmé et complété cette notion d'hétérogénéité des glycoprotéines du sérum sans introduire d'éléments déterminants pour leur classification.

Depuis 1940, tous les travaux consacrés à l'étude des glycoprotéines du sérum ne peuvent que compléter leur nomenclature individuelle en se référant à une connaissance plus précise de leur rôle physiologique ou plus souvent encore aux progrès réalisés dans leur fractionnement et leur identification. C'est à cette nomenclature individuelle que nous devons nous référer pour la terminologie des glycoprotéines caractérisées dans l'extrait phyrique du sérum humain. Aussi tenterons nous de définir les critères fondamentaux susceptibles d'être retenus actuellement pour leur définition et leur identification.

Dans un mélange de molécules aussi complexes que celui des glycoprotéines du sérum, leur nomenclature doit se référer simultanément à leur définition d'hétéroprotéines et à tout un ensemble de critères fondés sur leurs propriétés physico-chimiques spécifiques utilisées en vue de leur isolement ou de leur identification.

I. DEFINITION DES GLYCOPROTEINES DU SERUM :

Toutes les glycoprotéines du sérum renferment une ou plusieurs chaînes d'hétéropolysaccharides attachés à une partie polypeptidique par une liaison stable de covalence. La grande variabilité de composition des parts respectives des copules glucidiques et peptidiques fait que l'on trouvera tous les intermédiaires entre certaines molécules comme la préalbumine qui possède toutes les propriétés générales d'une protéine et la glycoprotéine acide α_1 qui renferme près de 40 p. 100 de glucides combinés et diffère déjà des holoprotéines par ses caractères de thermostabilité (MONTREUIL, 118).

La composition chimique d'une glycoprotéine du sérum ne présente toutefois qu'un élément relativement secondaire pour son identification. L'étude de sa composition glucidique (tableau X) représente plus un critère de pureté de la préparation obtenue qu'une méthode susceptible de conduire à son identification. Il en est de même pour son dosage d'azote. L'étude de sa composition en acides aminés permettra d'identifier la préalbumine riche en tryptophane (2,5 à 2,7 p. 100). Au sein des β_1 glycoprotéines la teneur en tryptophane de l'hémopexine est relativement caractéristique. Inversement l'une des α_1 glycoprotéines qui ne renferme que 0,35 p. 100 de tryptophane fut dénommée par HAUPT et coll. (119) glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophane". Pour d'autres glycoprotéines la richesse en proline (10,18 p. 100 de la glycoprotéine α_2 "HS" apparaît assez caractéristique.

Les métalloglycoprotéines à fer (transferrine) ou à cuivre (céruloplasmine) représentent des entités bien connues actuellement.

Glycoprotéine	S ₂₀ w	Hexoses	Hexosamine	Acide N-acétyl- neuraminique	Fucose
Préalbumine	4,1	0,4	0,1	-	-
Glycop.acide α_1	3,1	14,7	13,9	12,1	0,7
Antitrypsine α_1	3,8	4,7	3,9	3,6	0,2
Glycop. α_1 "aisément pré- cipitable".	3,8	4,8	4,4	3,7	0,4
Glycop. α_1 "pauvre en tryp- tophanne".	3,3	5,5	4,5	3,4	0,3
Glycop. α_1 "X"	5,0	8,0	6,0	8,0	0,7
Postalbumine 4,6 S.	4,6	4,0	2,8	3,0	0,2
Inhibit. trypsine inter α_1 - α_2	6,4	3,4	3,5	2,1	0,1
Glycop. α_2 "GC"	3,7	2,0	2,0	0	0,2
Glycop.acide α_2	3,7	12,0	13	17	0,6
Céruléoplasmine	7,1	3,0	2,4	2,4	0,18
Glycop. α_2 "HS"	3,6	5,2	3,9	4,1	0,2
Haptoglobines	4,1	7,8	5,3	5,3	0,2
Macroglobuline α_2	19,5	3,6	2,9	1,8	0,1
Hemopexine	4,8	9,0	7,4	5,0	0,4
Transferrine	4,7	2,4	2,0	1,4	0,07
Glycop. β_1 " "	6,3	-	-	-	-
Globulines γ "A"	7,0	3,2	2,9	1,8	0,22
Glycop. β_2	2,9	6,7	5,8	4,4	0,2
Globulines γ "M"	19	5,4	4,4	1,3	0,7
Globulines γ "G"	6,6	1,1	1,3	0,3	0,2

Tableau N° X : Constante de sédimentation et composition glucidique des glycoprotéines du sérum sanguin. (résultats exprimés en g. p. 100 de la préparation).

Néanmoins l'apport des méthodes d'études chimiques des glycoprotéines reste comme on le voit très limité pour leur identification.

II.- CRITERES PHYSICO-CHIMIQUES D'IDENTIFICATION.

C'est en se référant à tout un ensemble de technique d'analyse fondées sur différentes propriétés physico-chimiques caractéristiques que l'on peut généralement aboutir à la nomenclature individuelle des glycoprotéines. Cette nomenclature se réfère le plus souvent à la terminologie adoptée par l'auteur qui en réalisa la première préparation. Il existe toutefois pour certaines d'entre elles plusieurs synonymes introduits au cours de travaux réalisés simultanément sur la même glycoprotéine par différents groupes de chercheurs. Nous rappelons ces termes synonymes dans le tableau XI. Dans l'ordre d'une spécificité individuelle nous pouvons successivement envisager les méthodes fondées sur :

- les caractères de précipitation qui séparent des groupes de glycoprotéines et sont généralement mises à profit pour leur préparation.

- La mobilité électrophorétique généralement recherchée en milieu tamponné à pH 8,2 et 8,6, mais susceptible également de définir certaines glycoprotéines par leur comportement électrophorétique en milieu acide (pH 3,9 à 4,5).

- Le poids moléculaire qui représente déjà un caractère beaucoup plus spécifique de certaines de ces molécules, utilisé parfois pour leur nomenclature, mis à profit pour leur fractionnement en chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G. 200 et combiné à la séparation électrophorétique dans l'électrophorèse en gel d'amidon.

Nomenclature retenue	Synonymes	Bibliographie
Préalbumine	Préalbumine riche en tryptophane - Thyroxin binding prealbumine	SCHULTZE 120-121
Glycop. acide α_1	Orosomucoide Séromucoide acide α_1	WEIMER 122, SMITH 123 SCHMID 124
Antitrypsine α_1	Glycop. α_1 "3,5 S"	BUNDY 125, SCHULTZE 126-127
Glycop. α_2 "GC"	α_2 "group component"	HIRSCHFELD 128-129-130 SCHULTZE 131-132
Haptoglobine	Séromucoide α_2	JAYLE 133-134, HERMAN-BOUSSIER 135
Glycop. acide α_2	α_2 neuramino-glycop. séromucoide acide α_2	SCHULTZE 136
Glycop. α_2 "HS"	glycop. α_2 "Ba" glycop. α_2 "Zn"	SCHMID 137-138-139-140 BURGI 141 - SCHULTZE 142
Seromucoide β_1	Globuline β_1 "B" Hémopexine	BISERTE 143-144 SCHULTZE 145, GRABAR 146
Transferrine	Sidérophiline	LAVRELL 147
Globulines γ "A"	Globulines γ_2 "A" Globulines γ_1 "A" Immunoglobulines γ "A"	HEREMANS 148
Glycop. β_2	β_2 mucoide	SCHULTZE 149
Globulines γ "M"	Globulines β_2 "M" Globulines γ_1 "M" β_2 macroglobulines Immunoglobulines "M"	HEREMANS 150
Globulines γ "G"	Globulines γ_7 "S" globulines γ "SS" Immunoglobulines γ "G"	HEREMANS 151

Tableau XI. Nomenclature et synonymes pour certaines des glycoprotéines.

- La spécificité antigénique fondée essentiellement sur les éléments caractéristiques de leur structure polypeptidique et combinée dans l'immunoélectrophorèse à la recherche de leur diffusion en milieu gélifié et à leur mobilité électrophorétique.

A. Recherche des caractères de précipitation.

Le relargage par le sulfate d'ammonium initialement utilisé pour définir au sein des protéines du sérum le groupe de "globulines" précipité à demi-saturation en sulfate d'ammonium à pH neutre, est souvent retenu pour le fractionnement des glycoprotéines du sérum. Son utilisation permet actuellement de définir des groupes de glycoprotéines selon leur zone de relargage (tableau XII).

Le fractionnement éthanolique largement utilisé pour la préparation industrielle de certaines fractions de protéines pour usages thérapeutiques (gamma-globulines, sérumalbumine etc.) s'avère d'utilisation plus délicate sur des quantités limitées de préparation.

Les agents de défécation des protéines avaient initialement permis de reconnaître l'existence dans le sérum humain d'une fraction de glycoprotéines échappant à cette précipitation (BYWATERS -152-). Dès 1948, WINZLER et coll. (153-154) séparent de l'ensemble des glycoprotéines du sérum, une fraction soluble dans l'acide perchlorique 0,6 N. mais précipitée par l'acide phosphotungstique. Initialement dénommée fraction des "séromucoides", son hétérogénéité fut précisée par BISERTE et coll. (155) sur les données de l'analyse immunoélectrophorétique et de la chromatographie sur DEAE cellulose. Ces caractères de solubilité de certaines glycoprotéines du sérum sont utilisés par SCHULTZE et coll. (156) pour la définition du groupe des glycoprotéines solubles dans l'acide perchlorique 0,2 N. et reste encore utilisée actuellement dans certaines étapes de leur isolement (Tableau XII.)

GLYCOPROTEINE.	Zone de relargage au $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	Rivanol 2p. 100 pH 7,0	Rivanol 0,84 p. 100 pH 8,0	$\text{CO}_3 \text{H}$ 0,02 N	CCl_3 COOH 2,5 p. 100
Solution à 1p. 100					
Préalbumine	2,5 à 3,0 M pH 5,0	+	+	-	+
Glycop. acide χ_1	3,2 à 4,0 M pH 7,0	-	-	-	-
Antitrypsine χ_1	2,0 à 3,2 M pH 7,0	+	-	-	+
Glycop. χ_1 "aisément précipit."	1,5 à 2,0 M pH 7,0	+	+	+	+
Glycop. χ_1 "pauvre en tryptophane"	2,0 à 2,6 M pH 7,0	+	+	-	+
Glycop. χ_1 "X"	2,4 à 3,2 M pH 5,0	+	+	-	-
Postalbumine 4,6 S.	2,0 à 2,4 M pH 7,0	+	+	+	+
Inhib. trypsine inter $\chi_1 \chi_2$	1,7 à 1,9 M pH 7,0	+	+	+	+
Glycop. χ_2 "GC"	2,0 à 2,4 M pH 5,0	+	+	-	+
Glycop. acide χ_2	2,0 à 2,8 M 5,0	+	+	-	-
Céruleoplasmine	1,8 à 2,3 M pH 7,0	+	+	+	+
Glycop. χ_2 "HS"	1,1 à 1,4 M pH 7,0	+	-	-	+
Haptoglobines	1,8 à 2,4 M pH 5,0	+	+	-	+
Macroglobulines χ_2	1,6 à 1,8 M Ph 7,0	+	+	+	+
Hémopexine	2,4 à 3,2 M pH 5,0	-	-	-	-
Transferrine	2,5 à 3,0 M pH 7,0	-	-	+	+
Glycoprotéine β_1 "A"	1,4 à 2,2 M pH 7,0	-	+	+	+
Globuline "A"	1,3 à 2,0 M pH 7,0	-	+	+	+
Glycoprotéine β_2	1,4 à 1,8 M pH 5,0	-	-	-	-
Globuline γ "M"	1,3 à 1,8 M pH 7,0	+	+	+	+
Globulines χ "GS"	1,3 à 1,8 M pH 7,0	-	-	+	+

BUS
LILLE

Tableau XII. CARACTERES DE PRECIPITATION DES GLYCOPROTEINES DU SERUM.

(+) : précipité par le réactif.

(-) : soluble dans le réactif.

Le Rivanol utilisé pour la première fois en 1954 par HOREJSI et SMETANA (157) pour le fractionnement des protéines du sérum, complète actuellement la gamme des agents de relargage utilisés par KORINEK et Coll. (158) et surtout par SCHULTZE et coll. (159) pour l'isolement des glycoprotéines du sérum. La solubilité sélective de certaines glycoprotéines vis-à-vis du Rivanol le rend en effet utilisable pour compléter certaines étapes de leurs purification. Nous avons retenu deux modes d'utilisation du Rivanol qui montrent la variation des caractères de solubilité de certaines glycoprotéines selon la concentration en Rivanol (2 p. 100 ou 0,84 p. 100) et le pH utilisé (Tableau XII.) Ces méthodes essentiellement préparatives prennent néanmoins un grand intérêt pour la caractérisation et l'identification de certaines glycoprotéines présentes en quantité faible dans le sérum humain et qui échappent parfois à d'autres méthodes d'identification.

B. Propriétés physico-chimiques des glycoprotéines :

L'électrophorèse des protéines du sérum à pH 8,6 caractérise 3 groupes majeurs de glycoprotéines : les α_1 glycoprotéines, les α_2 glycoprotéines et les β glycoprotéines. Deux groupes mineurs sont représentés par les γ globulines et une fraction de glycoprotéines de mobilité électrophorétique analogue à celle de la sérumalbumine. Chacun de ces groupes ne représente en réalité qu'une distribution gaussienne d'une population moléculaire fort hétérogène. L'appartenance d'une glycoprotéine à l'un de ces groupes électrophorétiques représente toutefois l'élément de base de sa nomenclature.

L'électrophorèse du sérum en veine liquide à pH 4,5 (MEHL et Coll. -160- .) sur papier à pH 3,9 (BISERTE -161-162) caractérise un composant de faible point isoélectrique qui migre

vers l'anode, se colore intensément par le réactif de SCHIFF après oxydation périodique et s'identifie à la glycoprotéine acide α_1 (HAVEZ -163).

L'ultracentrifugation appliquée à l'ensemble des protéines du sérum s'avère douée d'un pouvoir résolutif très limité. Trois groupes de composants sont caractérisés : une fraction de constante de sédimentation 19 S. correspondant à des macroglobulines, un groupe de glycoprotéines de constante de sédimentation voisine de 7 S. et un groupe majeur de poids moléculaire plus faible qui se confond dans le sérum total avec la sérumalbumine. Un fractionnement analogue est actuellement obtenu par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G200.

Ce sont sans conteste l'électrophorèse sur gel d'amidon et l'immunoélectrophorèse sur gel d'agar qui représentent actuellement les méthodes de référence pour la nomenclature des glycoprotéines du sérum.

L'analyse immuno-électrophorétique réalise la précipitation spécifique d'un antigène préalablement séparé par électrophorèse dans un gel d'agar avec son anticorps homologue correspondant. L'avantage de cette méthode réside avant tout dans sa spécificité et sa grande sensibilité. Elle est toutefois limitée par la qualité des immunsérums obtenus par injection du mélange antigénique à l'animal.

Cette technique a permis de démontrer l'existence de 21 arcs de précipitation, classés selon leur mobilité électrophorétique et qui correspondent tous à des glycoprotéines spécifiques (Figure N° 5). Ce sont respectivement de l'anode vers la cathode.

- La préalbumine riche en tryptophanne.
- La glycoprotéine acide α_1 qui migre au niveau de la sérumalbumine.

- Dans les α_1 globulines : l'antitrypsine α_1 , la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable", la glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophanne", la glycoprotéine α_1 "X" et l'inhibiteur de trypsine inter $\alpha_1 - \alpha_2$.
- Dans les α_2 globulines : la glycoprotéine α_2 "GC", la glycoprotéine acide α_2 , la glycoprotéine α_2 "HS", l'haptoglobine et la macroglobuline α_2 (KUNKEL 164).
- Dans les β globulines : le séromucoïde β_1 , la transferrine et les glycoprotéines β_1 "A" et β_1 "C".
- Dans les β_2 et γ globulines : les globulines γ "A", la glycoprotéine β_2 , les globulines γ "M" et les globulines γ "G".

Dans le mélange complexe α_1 et α_2 glycoprotéines le pouvoir résolutif de l'immunoélectrophorèse reste toutefois trop limité pour permettre une identification de tous ces composants dans l'analyse directe du sérum total. D'autre part, l'absence de substances de référence gêne souvent l'identification de certaines glycoprotéines présentes en très faible quantité.

Il faut signaler enfin qu'une des α_1 glycoprotéines la glycoprotéine de constante de sédimentation 4,6 S. de faible pouvoir antigénique n'est jamais caractérisée dans ce diagramme (HEIDE -165-).

- L'électrophorèse sur gel d'amidon ajoute à la séparation fondée sur les mobilités électrophorétiques, une filtration moléculaire des protéines.

Dans le diagramme total du sérum humain les glycoprotéines se répartissent en 9 zones essentielles :

- la zone des pré-albumines où se localisent la préalbumine riche en tryptophanne et la glycoprotéine acide α_1 .

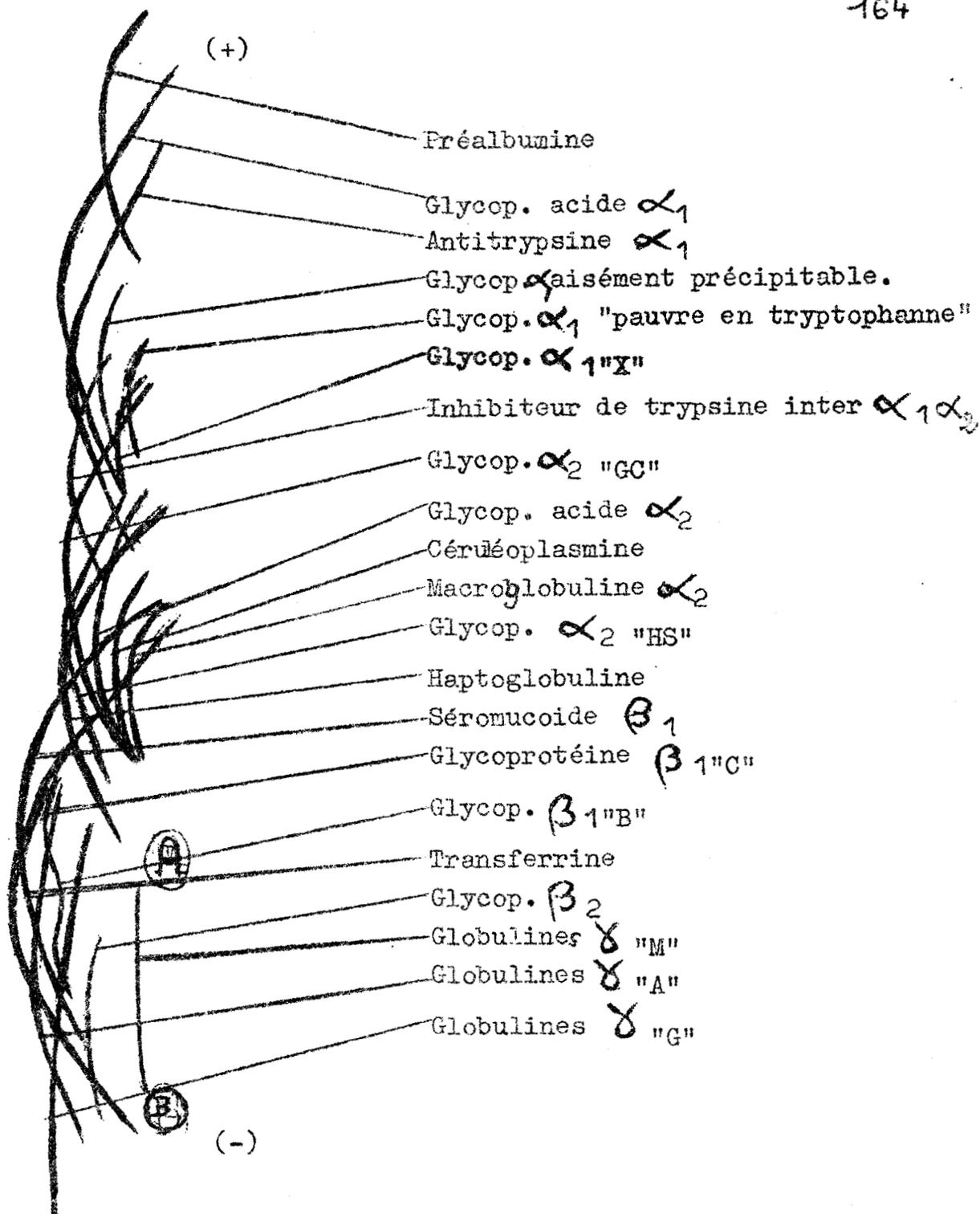


Figure N° 5 : Diagramme immunoélectrophorétique des glycoprotéines du sérum humain.

La position de chaque arc par rapport à la rigole de diffusion de l'immunsérum dépend naturellement de la concentration en glycoprotéine.

A = godet de dépôt utilisé pour un gel de gélose (M. 7)

B = godet de dépôt utilisé pour un gel d'agarose (M. 1)

- la zone de l'albumine où se place l'antitrypsine α_1 .
- la zone post-albumine constituée de l'anode vers la cathode par quatre bandes accolées qui correspondent successivement à la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable", à la glycoprotéine α_2 "HS", à la glycoprotéine α_2 "GC" et enfin au mélange de la glycoprotéine α_1 "X" et de la postalbumine "4,6 S."
- la zone des α_1 rapides renferme l'haptoglobine de type I et la céruléoplasmine.
- la zone des β globulines correspond à la transferrine, au sérumoïde β_1 , à la glycoprotéine acide α_2 et à l'inhibiteur de trypsine inter $\alpha_1 - \alpha_2$.
- la zone $\alpha - \beta$ - du diagramme comporte essentiellement les différentes formes d'haptoglobines de type II, mais renferme aussi une partie des globulines γ "A".
- la zone α lente identifiée par son composant majeur : la macroglobuline α_2 correspond également à la localisation de la glycoprotéine β_2 ainsi qu'à certaines globulines γ "G".
- les globulines γ "M" ne migrent pas dans ce support et restent donc au point de départ.
- Enfin, la zone cathodique correspond à certaines globulines γ "G".

Nous schématisons figure N° 6 le diagramme d'une électrophorèse sur gel d'amidon des glycoprotéines connues du sérum humain.

Aucune de ces techniques utilisées individuellement n'est capable de fournir une identification des glycoprotéines spécifiques. C'est en combinant la recherche des caractères spécifiques de précipitation aux méthodes d'identifications électrophorétiques et immunologiques que l'on peut actuellement envisager la définition d'un groupe de glycoprotéines.

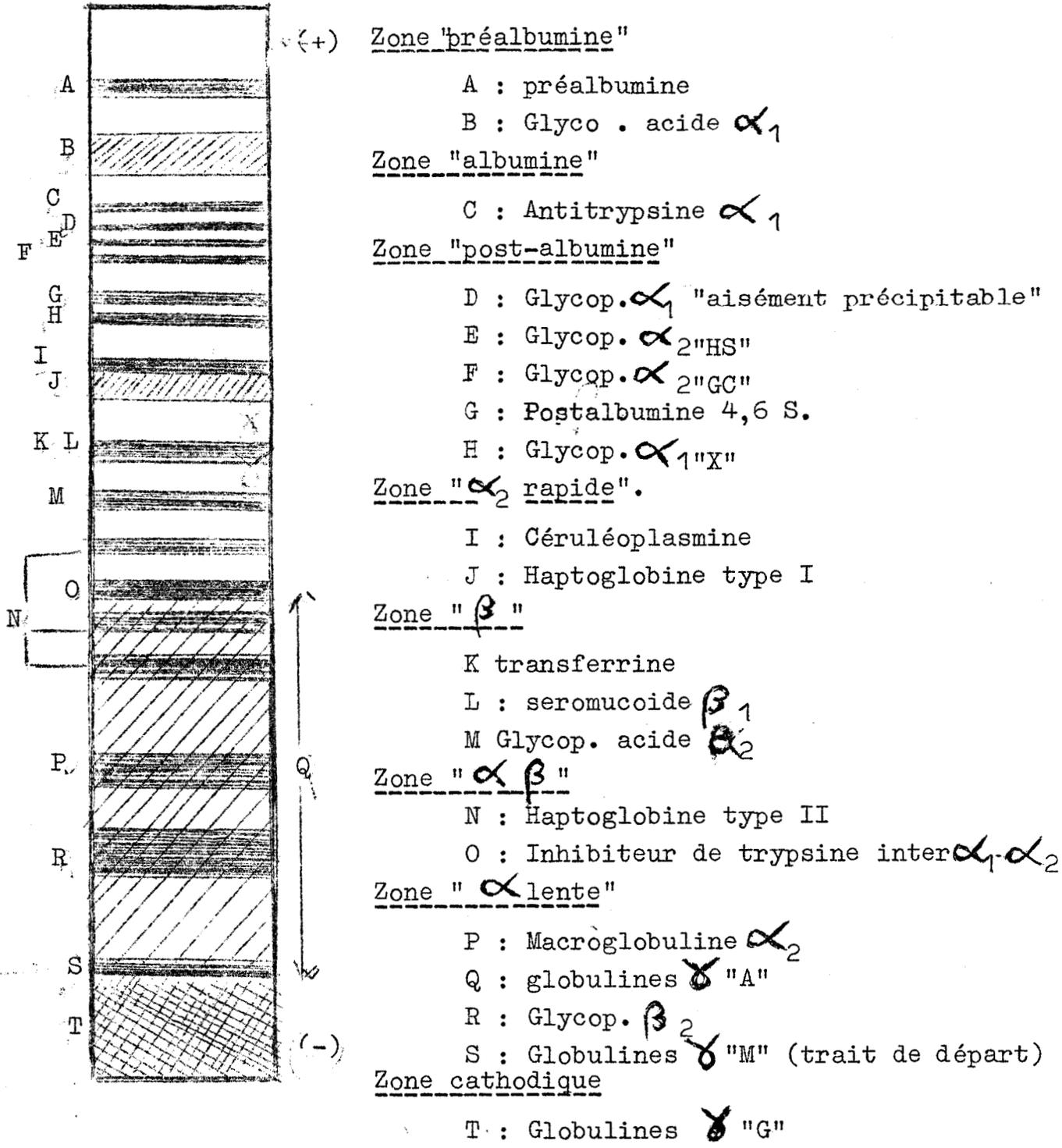


Figure N°67 : Diagramme théorique de l'électrophorèse en gel d'ami-
don des glycoprotéines du sérum sanguin.

(S) La glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophanne" n'a pas encore
été localisée sur ce type d'électrophorèse.

- S E P T I E M E C H A P I T R E -

ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA COMPOSITION DE L'EXTRAIT
PHYTIQUE D'UN SERUM SANGUIN.

I. COMPOSITION D'UN EXTRAIT PHYTIQUE OBTENU A pH 2,10 :

Nous effectuons cette étude sur un extrait phytique obtenu par les méthodes que nous décrivons à la partie technique : chapitre I. C. La précipitation est effectuée dans un milieu contenant 3 g./l. de chlorure de sodium. Chaque électrophorèse est pratiquée sur 2 à 4 mg. d'extrait phytique.

L'électrophorèse à pH 3,9 en tampon pyridine-acide acétique (partie technique : chapitre V. B) met en évidence un composant majeur de mobilité anodique, intensément coloré par le réactif de SCHIFF après oxydation périodique. Cette fraction M.1 caractérise la glycoprotéine acide α_1 (HAVEZ 166). La fraction M. 2 de mobilité faiblement anodique est quantitativement peu importante. Toutefois, la fraction A de mobilité faiblement cathodique donne une coloration intense avec le noir amido mais faible avec le réactif de SCHIFF après action de l'acide périodique. Cette fraction est représentée par des glycoprotéines neutres de copule glucidique restreinte et particulièrement pauvre en acide N-acétylneuraminique (CHABRE -167-). Les fractions B et C, de mobilité franchement cathodique et caractéristique des holoprotéines comme la sérumalbumine, ne peuvent être mises en évidence sur l'électrophorèse à pH 3,9 de l'extrait phytique (figure N° 7).

L'électrophorèse sur papier à pH 8,6 et sur gel d'agar à pH 8,2 (partie technique : chapitres V A et V. D) met en évidence une fraction de mobilité supérieure à celle de la sérumalbumine (figure N° 8). La préalbumine riche en tryptophane est la seule glycoprotéine connue dans cette zone. Dans l'ordre des mobilités anodiques décroissantes on trouve une zone α_1 très intensément colorée par le réactif de SCHIFF après traitement par l'acide périodique. Cette fraction doit correspondre à la glycoprotéine acide α_1 déjà signalée par l'électrophorèse à pH 3,9, ce qui n'élimine pas la présence éventuelle de sérumalbumine et de certaines autres α_1 glycoprotéines. Ces problèmes seront abordés plus loin par d'autres méthodes. La zone α_2 est quantitativement peu importante mais nettement visible alors que la zone β_1 et β_2 est intensément colorée mais surtout par le noir amido.

L'électrophorèse sur gel d'amidon met en évidence l'hétérogénéité de l'extrait phytique. Son interprétation ne peut être entreprise valablement à ce stade de notre exposé, et nous la reprendrons plus en détail lors de l'étude des divers fractionnements de l'extrait phytique. Nous noterons simplement pour le moment que les zones pré-albumine, albumine, post-albumine, " $\alpha\beta$ " et " α_2 lente" donnent des colorations par le noir amido.

II. INFLUENCE DE DIVERS PARAMETRES SUR LA COMPOSITION DE L'EXTRAIT PHYTIQUE.

Nous avons vu au troisième chapitre que divers paramètres pouvaient modifier la précipitabilité d'une protéine par l'acide phytique. C'est ainsi que pour certaines conditions de pH, de force ionique et de concentration insuffisante en acide phytique la précipitation peut être inhibée. Une protéine normalement précipitable peut se retrouver dans le surnageant

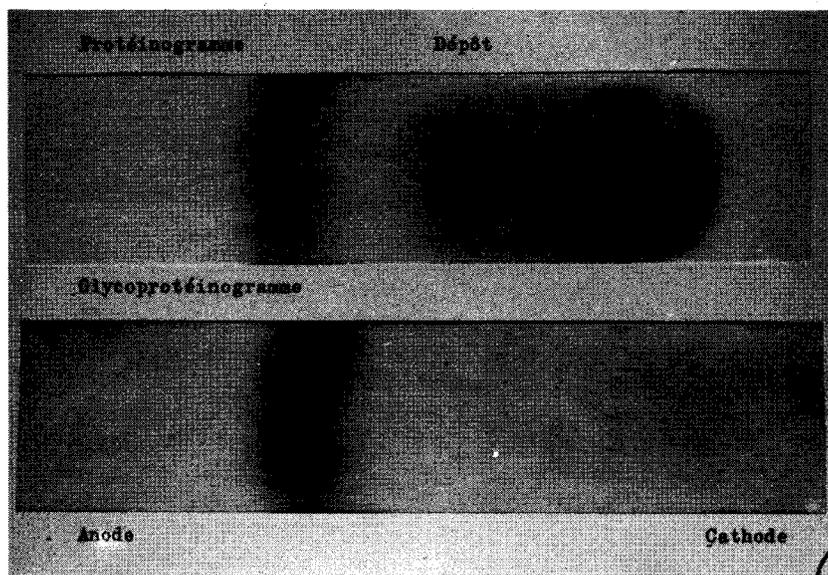


Figure N° 7 : Electrophorèse sur papier à pH 3,9 d'un extrait phytique total d'un sérum humain.
 - A : coloration par le noir amido.
 - B : coloration par le réactif de SCHIFF après oxydation périodique.

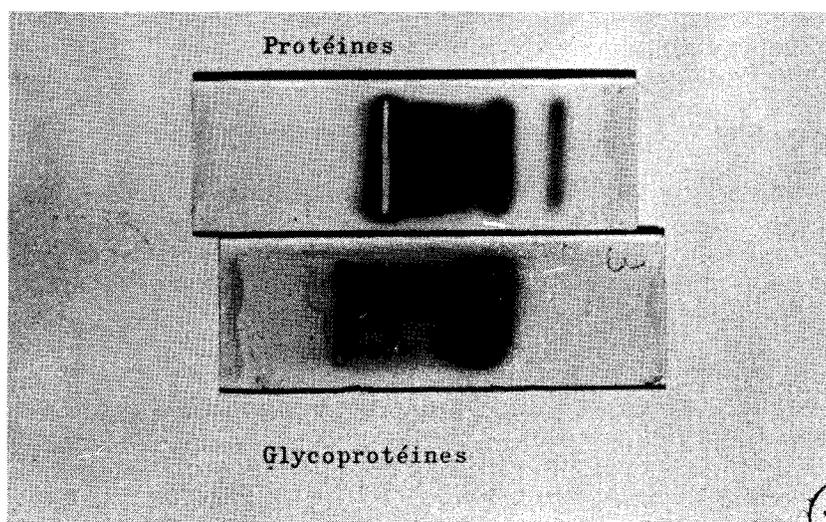


Figure N° 8 : Electrophorèse sur gel d'agar en milieu tamponné à pH 8,2.
 coloration par le noir amido.
 coloration par le réactif de SCHIFF après oxydation périodique.

phytique. Nous allons donc préparer des extraits phytiques d'un sérum dans des conditions très variables et préciser la nature des variations de composition. Ceci doit nous amener à mieux définir les causes d'erreurs à éviter lors de la défécation phytique.

A- Influence du ph du milieu lors de la précipitation sur la composition de l'extrait phytique.

Nous effectuons une précipitation phytique d'un sérum sanguin de façon à obtenir le milieu réactionnel suivant :

- dilution du sérum au dixième.
- acide phytique 0,01 N.
- chlorure de sodium 3 g/l.
- pH = 4,5 (au lieu de 2,10).

Dans ces conditions le précipité obtenu est peu abondant. Il est éliminé par centrifugation à 4° C. Une partie aliquote du surnageant est dialysée, concentrée, et, lyophilisée pour donner l'extrait phytique à pH 4,5. Le reste du surnageant à pH 4,5 est acidifié à pH 4,0. Le précipité phytique formé est éliminé par centrifugation et une partie de ce nouveau surnageant, traité comme précédemment, fournit l'extrait phytique à pH 4,0. Le reste de ce surnageant permet de préparer successivement des extraits phytiques à pH 3, à pH 2,5 et à pH 2. Nous obtenons ainsi, à partir d'un même sérum dilué, cinq extraits phytiques dont les différences de composition sont fonction des différences de pH.

La figure N° 9 reproduit les protéinogrammes sur gel d'agar en milieu tamponné à pH 8,2. La sérumbumine est le constituant majeur des extraits à pH 4,5 et 4,0. Elle a été partiellement éliminée de l'extrait à pH 3,0. L'analyse immunoelectrophorétique et l'électrophorèse en gel d'amidon confirme

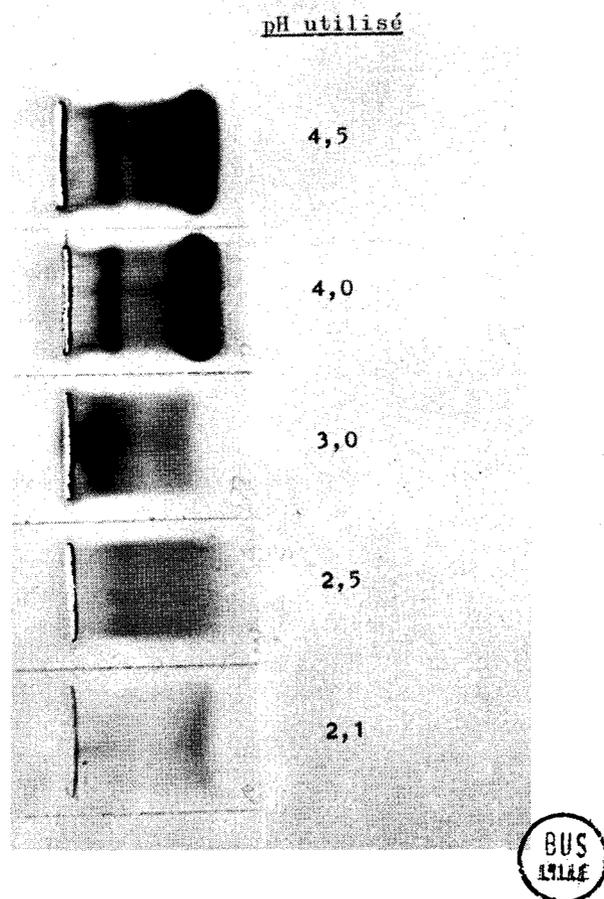


Figure N° 9 Influence du pH de la précipitation sur la composition de l'extrait phytique.

Electrophorèse sur gel d'agar en milieu tamponné à pH 8,2
Coloration par le noir amido. De haut en bas sont étudiées les préparations suivantes :

- extrait phytique à pH 4,5
- extrait phytique à pH 4,0
- extrait phytique à pH 3,0
- extrait phytique à pH 2,5
- extrait phytique à pH 2,1

la présence de sérumalbumine dans ces trois préparations et permet d'identifier la β_1 globulines à la transferrine. De plus on caractérise les globulines γ_{G} et γ_{A} surtout à pH 4,5 et 4,0 ainsi, qu'un certain nombre de composants mineurs difficiles à identifier sur des préparations aussi complexes. L'haptoglobine et la céruléoplasmine ne sont pas mises en évidence dans ces extraits.

Les extraits phytiques à pH 2,5 et 2,1 présentent une très nette différence de composition : la sérumalbumine et la transferrine ne figurent plus dans ces préparations. L'aspect des protéinogrammes se rapproche de celui des extraits optimum que nous avons décrits au chapitre précédent. La glycoprotéine acide α_1 est le constituant principal. Entre pH 2,5 et pH 2,1 on constate un enrichissement relatif des composants de mobilité α_1 et un appauvrissement concomittant en globulines de mobilité β . Lorsque le pH de la précipitation est inférieur à 2,0 on ne trouve dans l'extrait phytique que les seules glycoprotéines dont le point isoélectrique est voisin ou inférieur à pH 4,0.

Ces résultats sont à comparer avec ceux du paragraphe III du troisième chapitre. Nous avons alors mis en évidence une zone de pH (entre pH 3,6 et pH 4,6) pour laquelle la précipitation de la sérumalbumine et des globulines γ n'étaient que partielles. Nous devons donc les retrouver au moins partiellement dans le surnageant.

Cette étude qualitative du surnageant phytique à divers pH laisse entrevoir une classification possible des protéines du sérum.

1- Les glycoprotéines phytosolubles quelque soit le pH et qui constituent pratiquement l'extrait phytique à pH 2,10.

2- Les glycoprotéines dont la solubilité dans l'acide phytique n'est que relative et qui ne se trouvent dans le

surnageant que pour des pH relativement défavorables à l'ionisation de l'acide phytique. (pH voisin de 2,5).

3- Les glycoprotéines dont la réaction avec l'acide phytique est comparable à celle de la sérumalbumine. La transferrine serait le type de ces glycoprotéines.

4- Les glycoprotéines qui ne figurent jamais dans les extraits phytiques quelque soit les conditions de pH. L'haptoglobine et probablement la céruléoplasmine seraient à mettre dans cette catégorie de molécules.

Au cours des chapitres suivants nous nous attachons tout particulièrement à l'identification des glycoprotéines du premier groupe. C'est pourquoi nous retiendrons le pH 2,10 \pm 0,10 comme pH optimum pour la préparation des extraits phytiques.

B- Influence de la concentration du milieu en chlorure de sodium sur la composition de l'extrait phytique à pH 2,10.

Nous avons vu au paragraphe V du troisième chapitre que la précipitation phytique de certaines protéines peut être inhibée par la présence de chlorure de sodium dans le milieu réactionnel. Pour mettre en évidence le rôle de la force ionique sur la composition de l'extrait phytique nous préparons à partir d'un même mélange de sérum sanguin trois extraits. A part la présence de concentrations variables en chlorure de sodium dans le milieu réactionnel, les conditions de précipitations sont identiques pour toutes ces préparations :

- dilution du sérum au dixième.
- acide phytique 0,01 N.

- pH = 2,10 \pm 0,20.

La concentration en chlorure de sodium est de :

- 9 g/l. pour l'extrait A.

- 3 g/l. pour l'extrait B.

- Pour l'extrait C. on dilue le sérum par de l'eau distillée et on pratique la défécation phytique avec un réactif précipitant privé de sodium (R. 2).

Les surnageants sont traités selon la technique habituelle (partie technique : I. C 4). Dans le cas de l'extraction A le surnageant précipite par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 20 g/l. Les surnageants C et B ne précipitent pas dans les mêmes conditions. De plus, lors de la dialyse du surnageant A contre de l'eau distillée, il se forme très rapidement un précipité, plus particulièrement au voisinage de la membrane de cellophane. Le chlorure de sodium dialyse plus rapidement que l'acide phytique et la force ionique diminue. En présence de l'excès d'acide phytique non encore dialysé, les protéines anormalement phytosolubles précipitent. Ce précipité de phytate de protéine néoformé est isolé par centrifugation à 4° C, mis en suspension dans une solution isotonique de chlorure d'ammonium et alcalinisé modérément par addition goutte à goutte d'une solution normale d'ammoniaque jusqu'à dissolution presque complète. On dialyse à 4° C contre une solution isotonique de chlorure d'ammonium de pH 7,0 fréquemment changée, puis contre de l'eau distillée pour éliminer le chlorure d'ammonium. La suspension ainsi obtenue est lyophilisée. L'électrophorèse de zone et l'immunoélectrophorèse démontre quelle est constituée presque exclusivement de globulines γ_{G} et γ_{A} . On trouve aussi de petites quantités de protéines normalement phytosolubles probablement entraînées par adsorption sur le précipité (figure N° 10). Toutefois le composant de mobilité α_2 est à noter car sa concentration est loin d'être négligeable. Une α_1 globuline est bien révélée par un immunosérum spécifique de l'extrait

phytique. Enfin, une certaine proportion de la préparation difficilement soluble doit correspondre à des globulines γ_{G} et γ_{A} partiellement dénaturées pendant les manipulations.

- Etude électrophorétique de la composition des extraits A, B et C.

La figure N° 10 reproduit les protéinogrammes de ces extraits. La préparation A obtenue à partir d'un milieu isotonique se caractérise par une richesse en protéines de mobilité β_2 et γ . Les zones α_2 et α_1 et préalbumine sont nettement caractérisées. L'analyse immunoélectrophorétique et l'électrophorèse sur gel d'amidon identifie les globulines γ_{G} et γ_{A} comme constituants principaux de cet extrait. Nous avons déjà vu qu'une partie de ces protéines avait précipité lors de la dialyse de cette préparation.

Par opposition la préparation C est obtenue en milieu desionisé ne présente pratiquement que trois composants : préalbumine, globulines α_1 et α_1 lente (figure N° 10).

Entre ces deux extrêmes, se situent la préparation B. L'extrait phytique B obtenu en milieu demi-isotonique est relativement moins riche en globulines γ_{G} et γ_{A} que l'extrait A.

Ces protéinogrammes montrent bien l'influence de la force ionique sur la composition de l'extrait phytique. Pour la préparation d'un extrait aussi représentatif que possible des constituants phytosolubles du sérum il semble préférable d'opérer en présence de 3 g/l. de chlorure de sodium. Pour obtenir un extrait destiné à la caractérisation et à l'isolement de certaines glycoprotéines, le choix d'une force ionique convenable

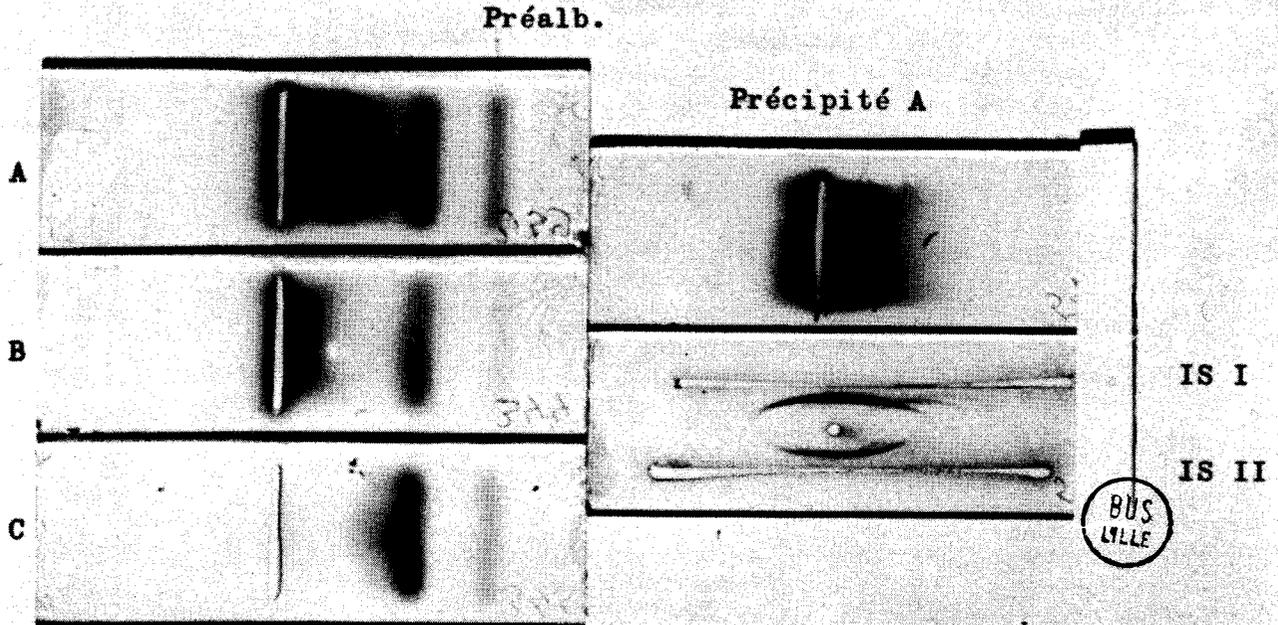


Figure N° 10 : Influence de la force ionique du milieu de défécation phytique sur la composition de l'extrait.

Electrophorèses sur gel d'agar en milieu tamponné à pH 8,2.
Coloration par le noir amido.

- A- extrait phytique préparé en milieu isotonique.
- B- extrait phytique préparé en milieu demi-isotonique.
- C- extrait phytique préparé en milieu privé d'ion sodium.

Précipité A : précipité formé lors de la dialyse de l'extrait phytique A.

permet d'obtenir une préparation plus riche en certaines fractions et de composition moins complexe, donc mieux adapté au but recherché.

C- Influence d'un léger défaut en acide phytique sur la composition de l'extrait phytique :

Nous avons vu au paragraphe IV du troisième chapitre que, si la concentration relative en acide phytique est insuffisante, la précipitation d'une protéine n'est que partielle. Les globulines γ précipitent pour une concentration relative en acide phytique plus faible que celle nécessaire à la précipitation totale de la sérumalbumine. Il nous faut donc établir sur un extrait phytique obtenu en présence d'un léger défaut en réactif précipitant, l'incidence de ce défaut sur la composition de l'extrait.

Pour préparer cet extrait on mélange successivement :

- 1 volume de sérum sanguin,
- 3 volumes de solution de chlorure de sodium à 9 g/l.
- 5 volumes d'eau distillée.

On ajuste à pH 2,10 avec une solution normale d'acide chlorhydrique. On ajoute ensuite par petites portions une solution normale d'acide phytique. Après chaque addition de réactif précipitant on agite et on filtre quelques millilitres de la suspension. On arrête l'addition de réactif précipitant lorsque le filtrat limpide ne donne plus qu'un trouble léger par addition d'un excès d'acide phytique. Le surnageant limpide ainsi obtenu est dialysé, concentré à une température inférieure à 40° et lyophilisé selon les techniques habituelles.

Le protéinogramme de cet extrait phytique met en évidence une quantité importante de γ -globulines ainsi qu'une forte proportion de β_1 et β_2 globulines. Ceci est confirmé par l'étude immunoélectrophorétique qui ne révèle par ailleurs aucune différence fondamentale de composition comparée à celle d'une préparation obtenue avec un excès d'acide phytique. En particulier on ne peut mettre en évidence ni transferrine, ni haptoglobine qui ne restent dans le surnageant que pour des concentrations très faibles en acide phytique. Dans ces conditions très défavorables la plupart des protéines sont partiellement solubles.

Les globulines γ_{G} sont donc les plus difficiles à précipiter par l'acide phytique lorsque l'on opère sur un mélange de protéine tel que le sérum sanguin. Ceci est d'autant plus remarquable que pour obtenir une précipitation à partir d'une solution pure, les γ globulines nécessitent une concentration relative plus faible que pour une solution analogue de sérumalbumine.

Il faut donc dissocier deux phénomènes :

1- certaines protéines comme la sérumalbumine sont plus avides d'acide phytique que d'autres, comme les γ globulines et en mélange, auront tendance à précipiter les premières.

2- Un poids donné de sérumalbumine se combine à un nombre de molécules d'acide phytique plus grand que ne le fait un poids égal de γ globulines. Pour précipiter totalement, la sérumalbumine nécessite donc une concentration en acide phytique plus élevée. Cette différence de consommation d'acide phytique pour obtenir une précipitation totale, se retrouve d'ailleurs dans la comparaison des indices de combinaisons phytique de ces protéines.

Par expérience nous savons que, pour les dilutions de protéines que nous utilisons, une concentration de 0,01 N en acide phytique est généralement suffisante. Il est toutefois prudent, avant de traiter un surnageant, de contrôler qu'un prélèvement de quelques millilitres ne précipite pas par addition d'un excès d'acide phytique.

CONCLUSIONS :

Nous savons maintenant que l'extrait phytique se compose pour une part très importante de glycoprotéines acide α_1 et de préalbumine à côté d'autres glycoprotéines caractérisées en plus faibles quantités.

Les conditions optimales pour obtenir un extrait phytique du sérum humain peuvent être définies comme suit :

- protéines : 6 à 8 g/l.
- pH : 2,10 \pm 0,20.
- acide phytique : 0,01 N.
- chlorure de sodium : 3 g/l.

Si l'on opère en présence d'une force ionique en chlorure de sodium plus importante (9 g/l.) on enrichit l'extrait en constituants de mobilité électrophorétique β_2 et γ . Si au contraire on opère en milieu desionisé la préparation obtenue est plus concentrée en α glycoprotéines et en préalbumine.

Dans des conditions défavorables à la formation de phytate de protéine (pH 2,5 à 3,0) ou de concentration en acide phytique légèrement insuffisante, les globulines γ_{G} se retrouvent dans l'extrait phytique, alors que les préparations obtenues dans les conditions optimales n'en contiennent que des traces. Ces globulines γ_{G} sont donc à considérer comme des composés partiellement phytosolubles.

- H U I T I E M E C H A P I T R E -

ETUDE IMMUNOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT PHYTIQUE.

Pour cette étude nous utilisons deux types d'immunsérums :

1- sérums de chevaux immunisés contre l'ensemble des protéines du sérum sanguin (Immunsérum N° 223 et 306 de l'Institut Pasteur de Paris) (M. 39).

2- sérums de lapins immunisés contre les protéines de divers extraits phytiques selon le protocole que nous avons décrit dans la partie technique (VII. E).

Les arcs de précipitation spécifiques des glycoprotéines de l'extrait phytique sont obtenus de deux manières :

1- On révèle une immunoélectrophorèse d'un extrait phytique avec les divers immunsérums.

2- On peut également chercher sur une immunoélectrophorèse d'un sérum sanguin quels sont les arcs révélés par les immunsérums spécifiques des glycoprotéines de l'extrait phytique.

Les grandes différences de concentration relative que l'on trouve dans les extraits phytiques et dans le sérum sanguin d'une part et d'autre part les grandes différences de réactivité des immunsérums globaux et spécifiques ^{font} qu'ils est impossible de révéler tous les composants sur une seule lame. Il nous faut donc pratiquer plusieurs immunoélectrophorèses avec des quantités variables de préparations pour obtenir une analyse complète.

Nous reproduisons figure N° 11 un schéma récapitulatif des arcs que l'on peut trouver sur les immunoélectrophorèses d'un extrait phytique ou que peuvent révéler les immunosérums spécifiques. Pour faciliter l'exposé, les arcs sont numérotés de 1 à 12.

Pour un certain nombre de ces arcs nous pouvons au moins à titre d'hypothèse les attribuer à des glycoprotéines connues. Pour d'autres, il nous faut quelques expériences complémentaires.

- L'arc N° 1 est caractéristique de la préalbumine. Les dosages de tryptophane doivent nous permettre son identification définitive.

- L'arc N° 2, toujours assez aplati correspond au composant majeur des extraits, il s'agit de la glycoprotéine acide α_1 qui est un mauvais antigène.

Au contraire, l'arc N° 3 est bien dessiné, concave et intensément coloré. Il peut être attribué à l'antitrypsine α_1 de SCHULTZE (168). Dans cette zone α_1 on trouve fréquemment un ou plusieurs arcs de faible courbure et assez éloignés de la rigole. Les constituants correspondants ne sont présents qu'à de très faibles concentrations. Nous devons chercher par des expériences complémentaires, à les identifier à certaines des post-albumines actuellement connues : glycoprotéine α_1 "aisément précipitable", glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophane", glycoprotéine α_1 "X" et inter $\alpha_1 - \alpha_2$ "inhibiteur de trypsine".

- Les arcs N° 7 et 8 de mobilité légèrement supérieure à celle de l'haptoglobine, sont d'intensité très variables d'une préparation à l'autre.

- Dans la zone β_1 , on trouve un arc (N° 9) très bien des-

(+)

182-

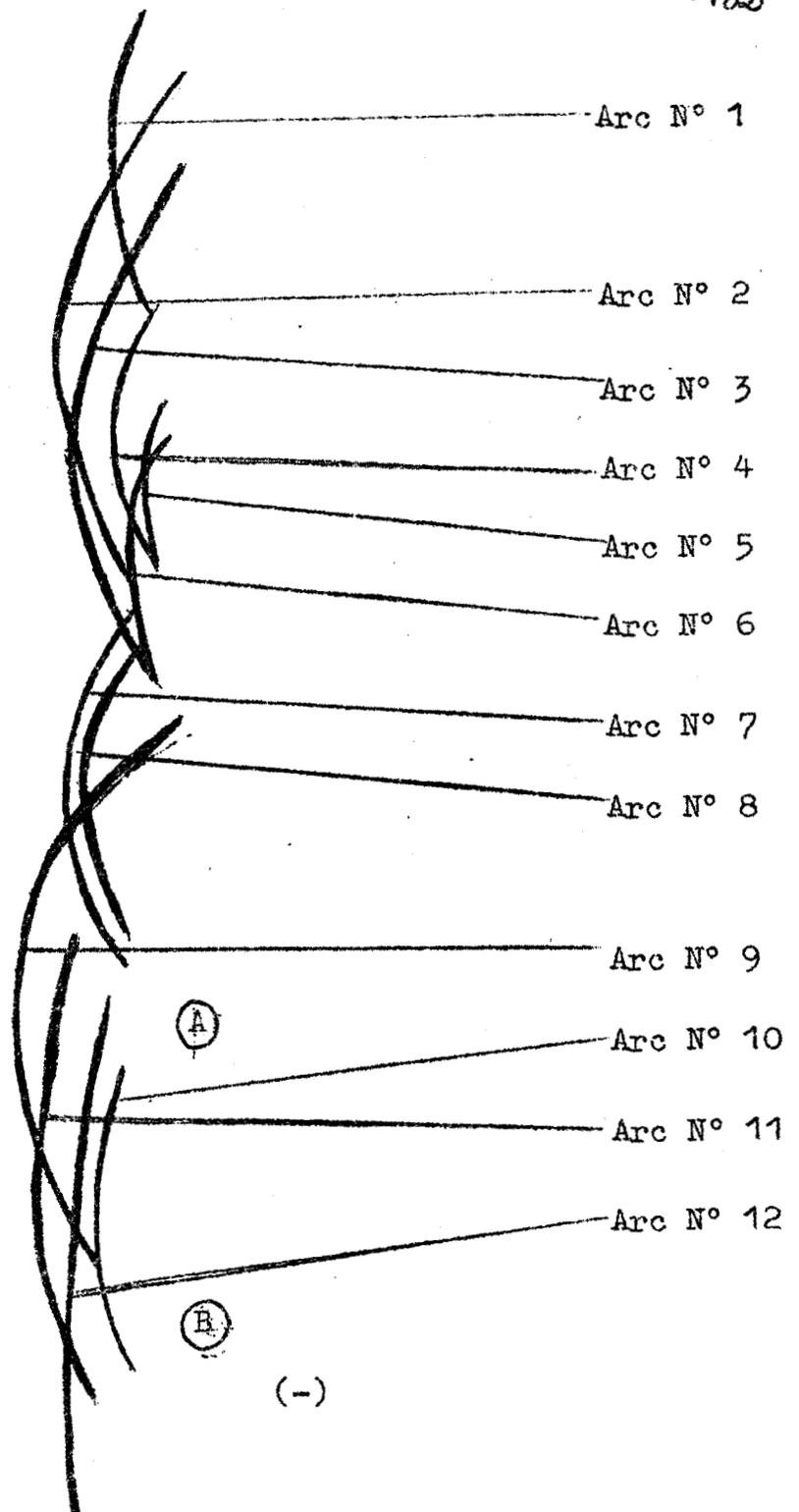


Figure N° 11 : Diagramme immunoélectrophorétique des glycoprotéines phytosolubles.

Nous proposons au onzième chapitre une interprétation de ce diagramme.

A = godet de dépôt utilisé pour un gel de gélose (M 7)

B = Fosse de dépôt utilisé pour un gel d'agarose (M. 1)

siné, assez large mais de contour précis. Sa mobilité électrophorétique est légèrement supérieure à celle de la transferrine. Il nous faut d'abord prouver qu'il ne s'agit pas de transferrine et ensuite, par des techniques spécifiques, l'identifier à l'une des β_1 glycoprotéines.

- L'arc N° 10 bien dessiné peut être attribué à la glycoprotéine β_2 .

- L'arc N° 11 très étiré et souvent déformé correspond à la globuline γ_{A} .

Enfin, nous avons fait figurer l'arc γ_{G} (arc N° 12) que l'on trouve dans certaines préparations pour les raisons que nous avons développées au chapitre précédent. Sa révélation par les immunosérums spécifiques des extraits phytiques se justifie par la communauté de certains déterminants antigéniques des globulines γ_{G} et γ_{A} .

Par la technique d'immunodiffusion d'OUCHTERLONY (partie technique : chapitre VII. B) on prouve indiscutablement que la transferrine, l'haptoglobine et la sérumalbumine ne figurent pas dans les extraits phytiques, obtenus dans les conditions optimales. En effet, les arcs obtenus avec ces protéines coupent franchement ceux correspondants à l'extrait phytique. Quel que soit la concentration et les immunosérums utilisés nous n'avons pu mettre en évidence aucun recouvrement pouvant laisser supposer que ces trois composés se trouvent même à l'état de trace dans les extraits phytiques. Elles peuvent donc être éliminées de l'interprétation de l'immunoélectrophorèse et les arcs N° 2, 7, 8 et 9 doivent être attribués à d'autres molécules.

Cette même technique nous prouve que la glycoprotéine acide α_1 et la globuline γ_{A} sont des composants majeurs de l'extrait phytique. L'absence de produits de référence nous empêche d'effectuer les autres identifications par la méthode d'OUCHTERLONY.

L'utilisation des quelques rares immunsérums vraiment spécifiques nous confirme ces premiers résultats. Un immunsérum commercial riche en anticorps spécifiques de la glycoprotéine $\alpha_{2\text{M}}$ ne donne pas de réaction positive avec les extraits phytiques.

CONCLUSIONS :

Cette technique s'avère donc très limitée dans ses possibilités d'identification de glycoprotéines mineures du sérum humain. A ce stade de notre travail nous pouvons affirmer l'existence dans l'extrait phytique du sérum de 11 glycoprotéines différentes parmi lesquelles sont identifiées avec certitude :

- La glycoprotéine acide α_1 et la globuline γ_{A} .

Nous éliminons définitivement l'existence de la sérumalbumine, de la transferrine, de l'haptoglobuline et de la céruléoplasmine qui représentent toutes des composants majeurs des protéines du sérum, aisément caractérisées par les méthodes habituelles.

Il nous reste à confirmer la nature chimique de la préalbumine et à identifier quatre ou cinq α_1 globulines, deux α_2 globulines, une β_1 globuline et une β_2 globuline.

- N E U V I E M E C H A P I T R E -

=====

IDENTIFICATION DES GLYCOPROTEINES DE L'EXTRAIT
PHYTIQUE PAR REACTIONS SPECIFIQUES.

La seule façon d'identifier avec certitude une glycoprotéine est de pratiquer, lorsqu'elle existe une réaction spécifique, qui généralement correspond au rôle biologique de cette molécule. C'est ainsi que l'on caractérise la transferrine par fixation du fer, la céruléoplasmine par son cuivre et ses propriétés peroxydasiques, l'haptoglobine par formation de son complexe avec l'hémoglobine et par l'étude de l'activité peroxydasique de celui-ci. Malheureusement nous ne disposons actuellement que d'un nombre très limité de réaction de ce type. Même quand le rôle physiologique d'une glycoprotéine est connu, les techniques d'identifications qui doivent en découler ne sont pas encore codifiées ou alors sont encore difficilement praticables par les laboratoires non spécialisés. C'est le cas par exemple des divers inhibiteurs de protéases et des transporteurs de thyroxines.

Parmi les protéines que nous cherchons à identifier seul le séromucoïde β_1 possède une réaction caractéristique. En effet, BISERTE et coll. (169) ont montré que le séromucoïde

β_1 peut se combiner avec le cytochrome c et la myoglobine alors que dans les mêmes conditions l'haptoglobine ne réagit pas. Une électrophorèse sur papier à pH 6,9 d'une solution de séromucoïde β_1 additionnée de cytochrome c de cheval, forme monomère du cytochrome, traitée par l'o-dianisidine révèle ce chromoprotéide. On peut ainsi mettre en évidence une

zone colorée en rose brunâtre autour du point de départ, qui correspond au cytochrome en excès et une autre zone plus précise de mobilité anodique qui met en évidence la combinaison du séromucoïde β_1 avec le cytochrome.

La caractérisation d'une forme combinée de cytochrome c avec l'un des composants de l'extrait phytique du sérum est démontrée en électrophorèse sur papier à pH 6,9 (figure N° 12). Cet extrait phytique utilisé seul ne renferme aucune trace de chromoprotéide révélé par l'o-dianisidine. Ce résultat confirme donc l'absence d'un complexe hémoglobine-haptoglobine et celle d'une forme de séromucoïde β_1 combiné à l'hème préexistante. Enfin la spécificité de la liaison du séromucoïde β_1 avec le cytochrome c nous permet d'envisager l'existence de cette glycoprotéine dans l'extrait phytique.

- D I X I E M E C H A P I T R E -
=====

APPLICATION DE DIVERSES TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT
A LA CARACTERISATION DES GLYCOPROTEINES PHYTOSOLUBLES

En l'absence de la plupart des produits de référence qui nous permettrait une identification immuno-chimique et faute de réaction spécifique nous sommes donc obligés de fractionner les extraits phytiques. La comparaison des résultats de l'étude électrophorétique et immuno-chimique de chaque fraction avec les propriétés physico-chimiques des glycoprotéines actuellement connues, doit nous permettre de progresser dans l'identification des composés phytosolubles.

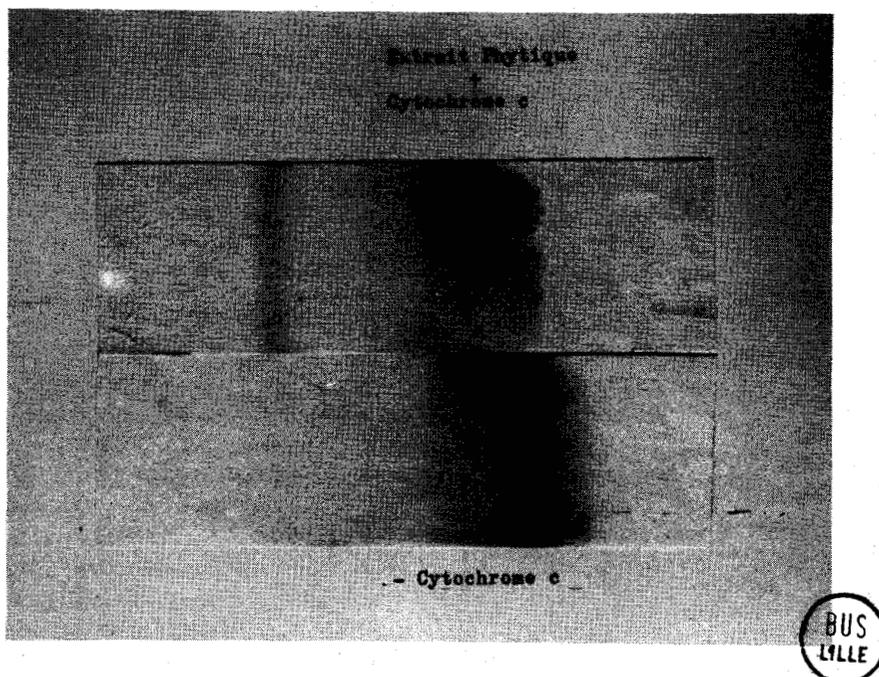


Figure N° 12 - Mise en évidence de la fixation du cytochrome c par le séromucoïde β_1 .

- A : Extrait phytique + cytochrome c
- B : Cytochrome c témoin

(Electrophorèses en milieu tamponné à pH 6,9 - coloration par l'o-dianisidine).

I. CARACTERISATION DES GLYCOPROTEINES PERCHLOROSOLUBLES DE
L'EXTRAIT PHYTIQUE.

Depuis les travaux de WINZLER (170-171) la solubilité dans l'acide perchlorique a permis d'isoler ou d'identifier certaines glycoprotéines. SCHULTZE et coll. (172) démontrent que cette solubilité est fonction de la concentration en acide perchlorique. L'extrait perchlorique 0,6 N est surtout constitué par la glycoprotéine acide α_1 alors que l'extrait perchlorique 0,2 N est beaucoup plus complexe. Ces auteurs y trouvent la glycoprotéine acide α_1 , l'antitrypsine α_1 , la glycoprotéine α_1 "X", la glycoprotéine acide α_2 , la glycoprotéine α_2 "GC", la glycoprotéine α_2 "HS", l'haptoglobine l'hémopexine et la glycoprotéine β_2 . Ces composants sont isolés par relargage par le sulfate d'ammonium, par électrophorèse préparative sur chlorure de polyvinyle et fractionnement par le Rivanol. L'extrait perchlorique 0,2 N contient en plus de faibles quantités de sérumalbumine, de transferrine et de globulines γ "A" et γ "G". C'est ce que nous avons trouvé sur un extrait perchlorique 0,2 N (partie technique : chapitre IX.)

La saturation d'un immunosérum anti-protéines sériques par l'extrait perchlorique 0,2 N fait disparaître l'arc correspondant à la glycoprotéine acide α_1 , à l'antitrypsine α_1 ainsi qu'aux globulines γ "A" et γ "G". Par ailleurs, l'intensité de l'arc est fortement diminuée.
transferrine

Avec un immunosérum spécifique des extraits phytiques, saturé dans les mêmes conditions par un extrait perchlorique 0,2 N nous ne pouvons obtenir aucune révélation sur une immunoelectrophorèse de sérum humain. Bien que ce type d'expérimentation donnant des résultats négatifs ne puisse fournir une

preuve absolue, on peut au moins admettre l'hypothèse que tous les composants antigéniques de l'extrait phytique se retrouvent au moins partiellement dans l'extrait perchlorique 0,2 N.

Une solution à 5 p. 100 de cet extrait perchlorique traité par l'acide phytique à pH 2,10 selon la technique habituelle donne un précipité faible, qui est éliminé. Le protéinogramme de la fraction phytosoluble comparé à celui de l'extrait perchlorique, révèle une concentration plus élevée en préalbumine et en α_1 glycoprotéine et plus faible en α_2 , et γ . La transferrine et l'haptoglobine ne figurent plus sur l'immunoélectrophorèse de cet extrait.

Inversement, une solution à 5 p. 100 d'un extrait phytique traité par l'acide perchlorique 0,2 N donne un léger précipité, constitué surtout par des β globulines (probablement glycoprotéine β_2 et sérumucoïde β_1 avec une trace d' α_1 et α_2 glycoprotéines visible sur l'immunoélectrophorèse (figure N° 13 lames A et B). Vu la trop faible quantité de matière isolée, il est impossible de préciser si nous sommes en présence de constituants mineurs encore inconnus ou bien s'il s'agit d'une précipitation partielle de glycoprotéines déjà identifiées. Dans la fraction perchlorosoluble de cet extrait phytique on retrouve sensiblement tous les composants de l'extrait phytique d'origine (figure 13, lames C et D).

CONCLUSIONS :

La comparaison de l'extraction par l'acide phytique 0,01 N. de pH 2,10 et par l'acide perchlorique 0,2 N. nous permet les déductions suivantes :

- Les glycoprotéines phytosolubles se retrouvent sensiblement dans l'extrait perchlorique 0,2 N. Toutefois lorsque

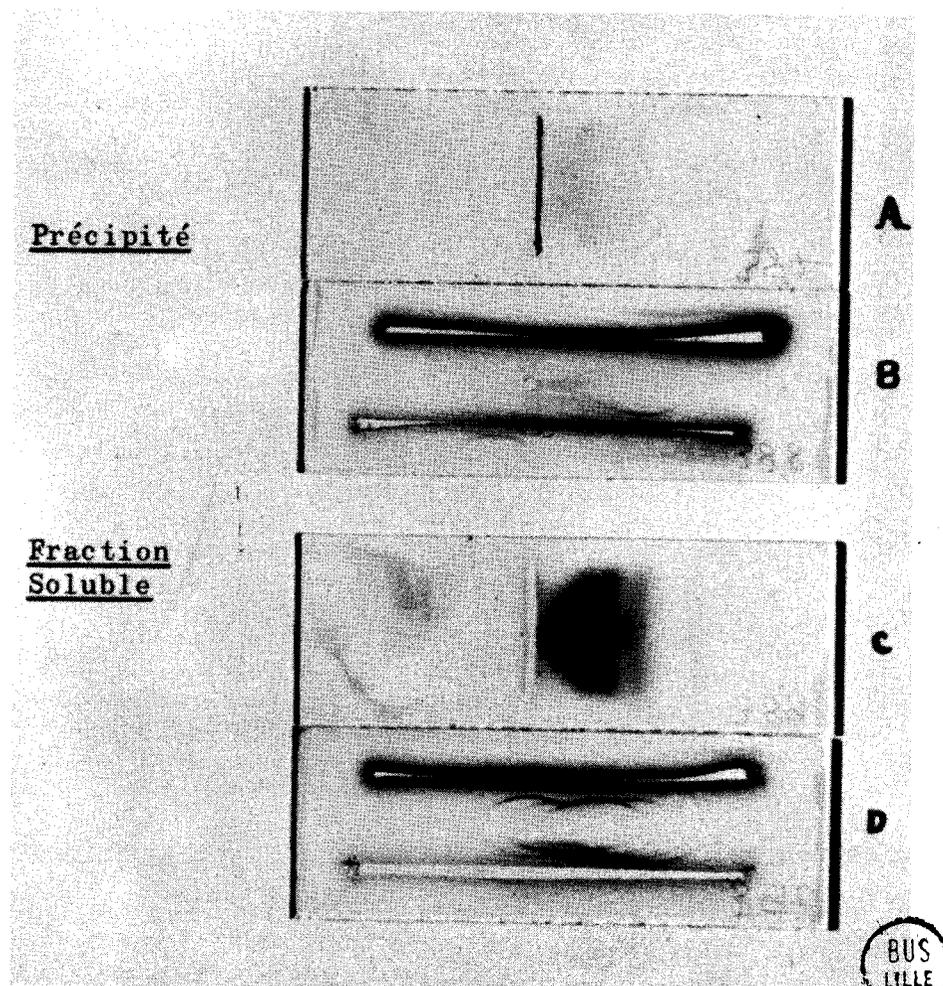


Figure N° 13 - Fractionnement d'un extrait phytique par l'acide perchlorique 0,2 N.

A et B : Fraction précipitée par l'acide perchlorique 0,2 N.

C et D : Fraction soluble dans l'acide perchlorique 0,2 N.

l'on traite un extrait phytique par l'acide perchlorique, on précipite une très faible quantité d' α_2 et β globulines.

- Inversement, le traitement par l'acide phytique à pH 2,10 permet d'éliminer d'un extrait perchlorique 0,2 N les traces d'haptoglobines, de transferrine et de sérumalbumine qui peuvent s'y trouver.

II. FRACTIONNEMENT D'UN EXTRAIT PHYTIQUE PAR LE RIVANOL.

Certains colorants dérivés de l'acridine comme le Rivanol précipitent de nombreuses protéines. Comme le montre STASTNY (173), la solubilité d'une protéine dans le Rivanol est fonction de la concentration en colorant, du pH du milieu et de la force ionique. SCHULTZE et coll. (174) appliquent cette technique au fractionnement des extraits perchloriques. Nous avons regroupé dans le tableau XII. les solubilités des divers glycoprotéines en solution à 1 p. 100 dans le Rivanol 2p. 100 à pH 7,0, et 0,84 p. 100 pH 8. La glycoprotéine acide α_1 , l'hémopexine, la transferrine, la glycoprotéine β_2 et les globulines γ_{A} et γ_{G} , se retrouvent dans le surnageant. Les glycoprotéines sont généralement plus solubles dans le Rivanol à 0,84 p. 100 à pH 8,0 (tableau XIV), conditions que nous utilisons pour notre expérimentation (partie technique : chapitre X.) Un extrait phytique traité par le Rivanol donne un précipité riche en préalbumine et en α_2 glycoprotéine, avec une trace de α_1 et β_2 globulines comme le montre le protéinogramme (figure n° 14). Le surnageant est composé d' α_1 et β_2 glycoprotéines avec des traces d' α_2 et β_1 globulines. Ces protéinogrammes sont vraiment complémentaires l'un de l'autre.

L'étude immunochimique permet d'identifier dans le précipité la préalbumine, deux α_1 glycoprotéines, une α_2 glycoprotéine ainsi qu'une trace de globulines γ "A". Dans le surnageant on caractérise la glycoprotéine acide α_1 , une autre α_1 glycoprotéine, une α_2 glycoprotéine, le séromucoïde β_1 et la glycoprotéine β_2 . L'électrophorèse à pH 3,9 confirme la présence de glycoprotéine acide α_1 à côté d'une importante fraction M 2 et d'une zone A nettement visible. La recherche du séromucoïde β_1 par fixation de cytochrome c de cheval et électrophorèse à pH 6,9 est fortement positive sur le surnageant.

Un immunosérum spécifique de la globuline γ "A" montre que cette glycoprotéine n'est que partiellement soluble dans le Rivanol et qu'une partie non négligeable se retrouve dans le précipité (Figure N° 14, lame D).

Malgré l'absence d'une rigueur absolue dans les caractères de précipitation ou de solubilité dans le Rivanol, les résultats obtenus nous permettent de considérer que cinq glycoprotéines caractérisées dans l'extrait phytique sont solubles dans le Rivanol à 0,84 p. 100 à pH 7,0. Ce sont respectivement la glycoprotéine acide α_1 (arc N° 2 du diagramme), une α_2 glycoprotéine (arc 7 ou 8), le séromucoïde β_1 (arc 9) et une glycoprotéine β_2 (arc 10). La globuline γ "A" (arc 11) est caractérisée dans la fraction soluble et dans le précipité.

III. FRACTIONNEMENT D'UN EXTRAIT PHYTIQUE PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN VEINE LIQUIDE

Un extrait phytique du sérum sanguin est soumis à l'électrophorèse préparative en veine liquide, effectuée en tampon tris-hydroxyméthylamino-méthane (0,008 M)-acide citrique

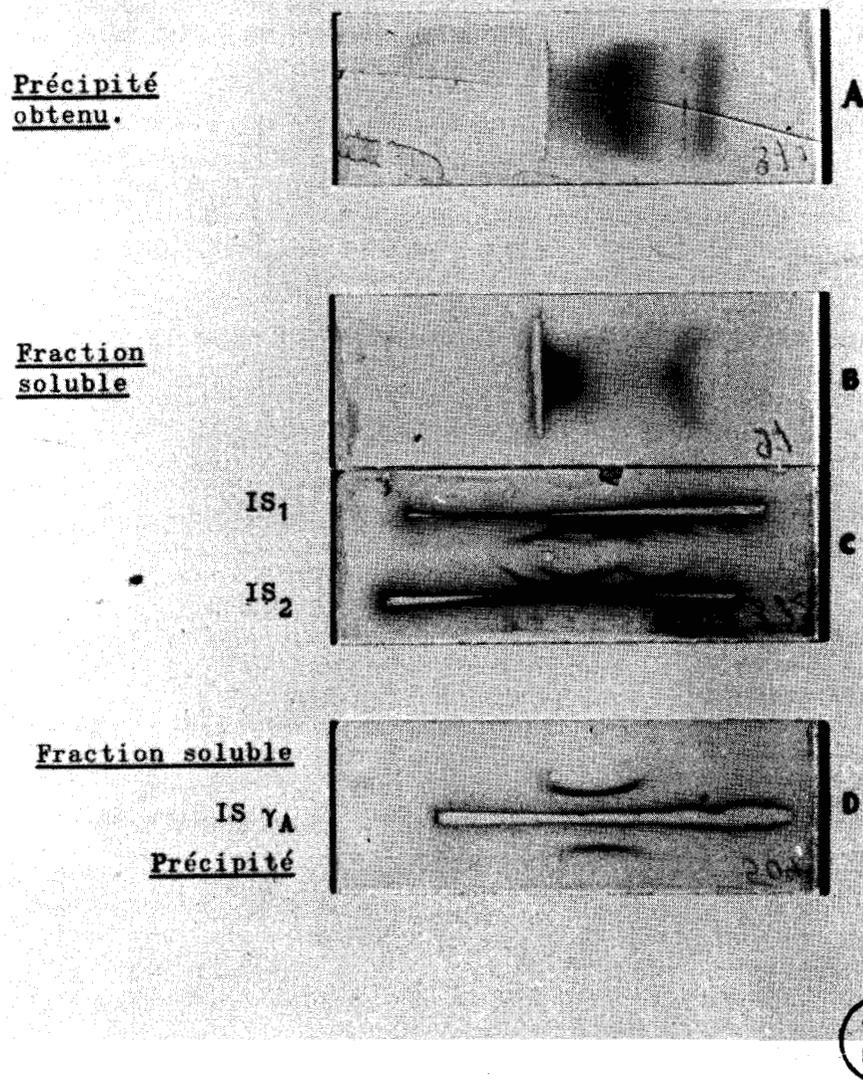


Figure N° 14 - Fractionnement d'un extrait phytique par le RIVANOL.

Fraction précipitée par le Rivanol 0,84 p. 100 pH 8,0.
 Fraction soluble dans le Rivanol 0,84 p. 100 pH 8,0.
 Mise en évidence des globulines γ "A" dans les fractions solubles et insolubles, à l'aide d'un immunosérum spécifique.

(0,008 M) de pH 8,6, avec un appareil Elphor-Vap (M. 12) avec un potentiel de 2 400 volts sous 160 milliampères. Une solution à 2,5 p. 100 d'un extrait phytique du sérum sanguin dans le tampon pH 8,6 est injectée dans une cuve à la vitesse de 2ml/h. La température est maintenue constante à 5° C. La vitesse de déplacement du film de liquide dans la chambre est de 0,5 m²/mn. Les fractions recueillies dans 48 tubes sont dosées à l'aide d'un appareil d'analyse automatique (M 33). On trace ainsi la courbe des concentrations en protéines, en oses réducteurs libérés par hydrolyse et en tryptophanne combiné (parties technique : chapitre VI B, C et D).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure N° 15. Une fraction de mobilité très rapide à pH 8,6 se caractérise par sa richesse en tryptophanne (Fraction 1). Elle précède immédiatement un pic homogène et symétrique riche en protéines et en oses combinés, qui représente le composant majeur de la préparation (fraction II). Un autre groupe de composant de mobilité α_2 et β globulines est identifié par le dosage des protéines. L'étude des courbes établies par le dosage des oses et du tryptophanne démontre son hétérogénéité et permet de distinguer 4 fractions différentes : une fraction rapide de mobilité α_2 globulinique correspondant à des glycoprotéines pauvre en tryptophanne (fraction III), une fraction β globulinique riche en tryptophanne (fraction IV), une fraction légèrement plus cathodique plus riche en glucides combinés (fraction V) et enfin un dernier groupe de composants β_2 globuliniques moins riches en glucides combinés (fraction VI).

Les fractions sont séparées, dialysées, puis lyophilisées. Une étude électrophorétique et immuno-électrophorétique en gel d'agar est pratiquée en utilisant des immunsérums préparés chez le lapin à partir d'extraits phytiques de sérum humain.

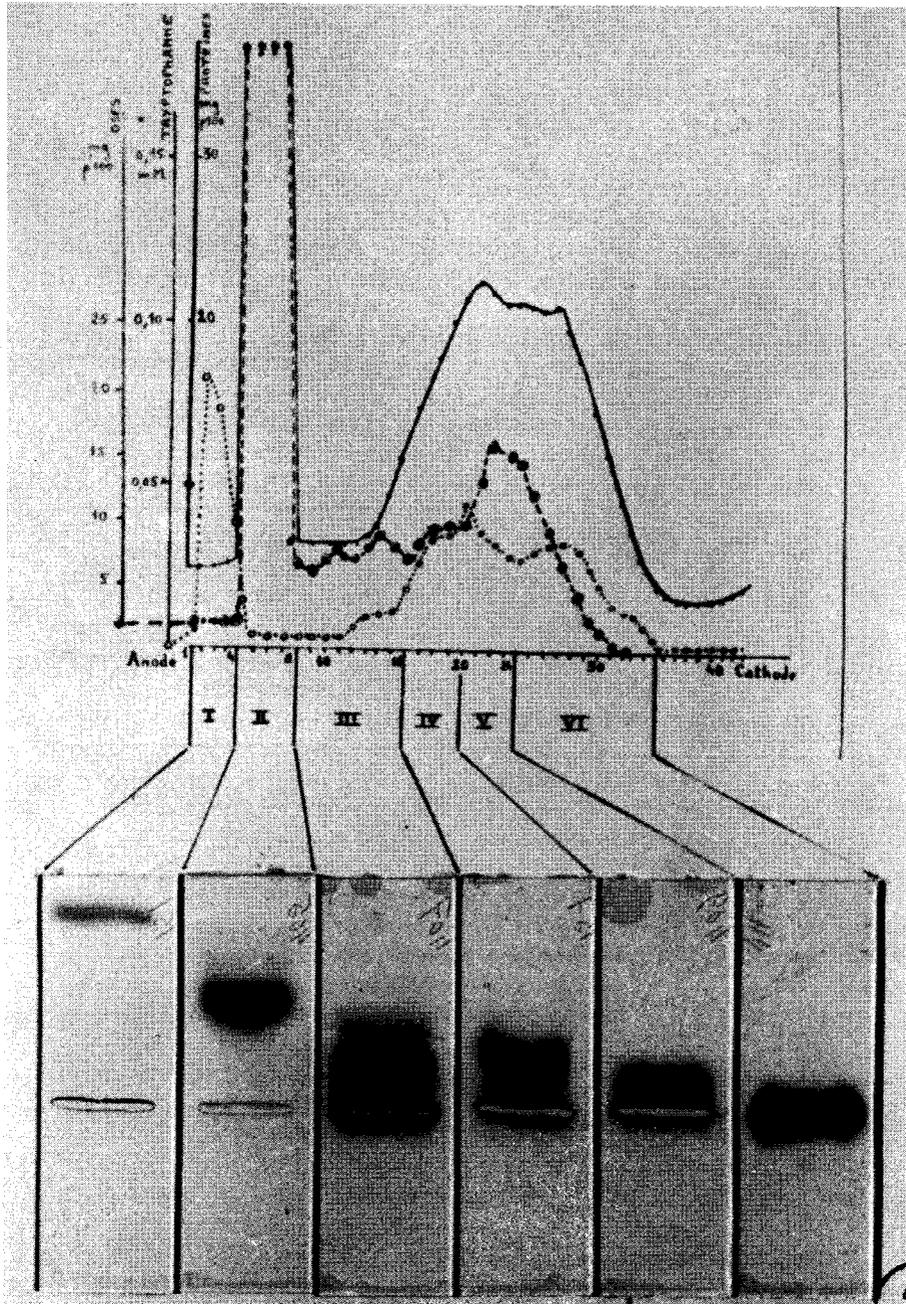


Figure N° 15 - Electrophorèse préparative en veine liquide de l'extrait phytique : les fractions sont recueillies dans 48 tubes.

Les dosages de protéines (en mg p. 100 ml : .----.----.), des osés réducteurs libérés par hydrolyse (en mg p. 100 ml : o----o----o) et du tryptophane (en millimoles : o-----o-----o) réalisées sur chacun des tubes permettent d'identifier 6 fractions numérotées de I à VI. Ces fractions sont étudiées en électrophorèse sur gel d'agar tamponné à pH 8,2.

La fraction I, riche en tryptophane, s'identifie à la préalbumine. Le composant majeur de la préparation (fraction II) correspond à la glycoprotéine acide α_1 . L'identification de cette glycoprotéine est réalisée par saturation des immunsérums avec des préparations de glycoprotéine acide α_1 purifiée, ainsi que par électrophorèse à pH 3,9 sur laquelle on observe une fraction homogène de mobilité anodique, intensément colorée par le réactif de SCHIFF après oxydation périodique. On y trouve en plus une petite quantité de préalbumine ainsi qu'une α_1 glycoprotéine visible sur l'immunoélectrophorèse.

La fraction III renferme 5 composants antigéniques : deux α_1 glycoprotéines, deux α_2 glycoprotéines et une β -globuline. L'étude immunochimique de ces préparations permet d'assimiler l'une des α_1 glycoprotéines à l'antitrypsine α_1 . Aucun de ces arcs de précipitation ne correspond à la céruloplasmine, ni à l'haptoglobine, ni à la macroglobuline α_2 .

La fraction IV présente un pouvoir de liaison vis-à-vis de l'hème et du cytochrome c. Elle se localise dans le diagramme par sa richesse en tryptophane (HEIMBURGER 175). Elle correspond donc au séromucoïde β_1 . On y décèle aussi un peu de globuline γ_{A} . La fraction V donne deux arcs de précipitation, que l'on peut rapporter aux globulines γ_{A} et à la ^{glyco-}protéine β_2 . La dernière fraction correspond encore aux globulines γ_{A} avec un peu de globulines γ_{G} . Ce qui est confirmé par la révélation d'une immunoélectrophorèse avec un immunsérum de lapin immunisé contre les globulines γ_{A} .

Cette expérience nous confirme un certain nombre d'identifications en particulier nous pouvons dès maintenant considérer comme certaines celle de la préalbumine, de la glycoprotéine α_1 , de l'antitrypsine α_1 , du séromucoïde β_1 , de la glycoprotéine β_2 , et des globulines γ_{A} et γ_{G} .

Il nous reste par contre à étudier les composants de la zone α_1 et α_2 globulinique.

IV. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT PHYTIQUE PAR FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHADEX G 200.

La chromatographie de filtration sur gel de Séphadex G 200 permet de fractionner un mélange de protéines en fonction des poids moléculaires (partie technique : chapitre IV. A). Nous avons tenté d'appliquer cette méthode à la caractérisation de certaines glycoprotéines de l'extrait phytique.

Pour illustrer nos résultats, nous décrivons un fractionnement effectué par passage de 300 mg d'un extrait phytique du sérum sanguin, sur une colonne de Séphadex G 200 (75 x 2 cm), équilibrée et éluée avec un tampon tris-hydroxyméthylamino-méthane (0,1 M)-chlorure de sodium (M) de pH 8,0. La courbe d'éluat est obtenue par lecture photométrique continue à 2780 Å de l'éluat qui est recueilli par fractions de 5 ml. Trois fractions sont séparées, les deux premières donnant à cette longueur d'ondes les densités optiques les plus fortes. Le contenu des tubes correspondant à chacune de ces trois fractions sont réunies, dialysées et lyophilisées.

La fraction F_1 correspond à des composés de poids moléculaires assez importants ($S_{20w} \geq 6$). L'électrophorèse en milieu gélifié tamponné à pH 8,2 caractérise une fraction diffuse dont la mobilité électrophorétique s'étend des α_2 aux β_2 globulines du sérum. L'immunoélectrophorèse met en évidence un arc de précipitation identifié aux globulines $\gamma_{\text{H}}^{\text{A}}$. On remarque en outre l'existence d'une fraction légèrement plus rapide que ces globulines $\gamma_{\text{H}}^{\text{A}}$ et qui correspond à une α_2 globuline non caractérisée en immunoélectrophorèse.

La fraction F_2 est plus complexe. On y retrouve les globulines γ_{A} à côté d'autres constituants identifiés à la préalbumine, la glycoprotéine acide α_1 , l'antitrypsine α_1 , une troisième α_1 non identifiée, deux α_2 globulines et au séromucoïde β_1 .

La fraction III, quantitativement mineure, correspond à des petites molécules. La glycoprotéine β_2 y est parfaitement identifiée. Cette fraction renferme en outre une certaine quantité de préalbumine.

Ce fractionnement s'avère donc très limité dans son pouvoir séparatif. Il confirme néanmoins l'absence dans l'extrait phytique de glycoprotéines de poids moléculaire supérieur à celui des globulines γ_{A} ($S_{20w} = 7$) et la présence d'une β_2 glycoprotéine de faible taille. Ceci confirme donc son identification avec la glycoprotéine β_2 de constante de sédimentation 2,9 S (voir tableau X.).

La majeure partie des composants de l'extrait phytique ont donc un comportement en chromatographie sur Sephadex G 200 qui les assimile à des molécules de sédimentation comprise entre 3 S. et 6 S.

V. FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS DE L'EXTRAIT PHYTIQUE PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.

Le relargage par le sulfate d'ammonium fournit une excellente technique de fractionnement pour les mélanges de protéines. Facile à pratiquer il ne dénature pas la plupart des protéines. Les fractions obtenues sont facilement isolées par centrifugation et purifiées par dialyse.

Cette technique présente toutefois quelques inconvénients. Il est difficile de définir de façon précise la zone de relargage d'une protéine particulière. La concentration en protéine dans la solution peut entraîner des variations notables de la précipitabilité. Même en opérant en solution diluée, il est impossible d'éviter la coprécipitation de certaines protéines normalement solubles dans les conditions de l'expérience. Cela ne gêne en rien l'étude des composants majeurs d'une fraction. Par contre pour l'étude des constituants mineurs il est difficile de les différencier des protéines partiellement coprécipitées.

La composition d'une fraction obtenue par addition de sulfate d'ammonium à une solution de protéine n'est pas fonction uniquement de la variation de concentration en sulfate d'ammonium, mais dans une certaine mesure dépend des traitements préalables par ce réactif. Par exemple, la fraction des protéines précipitées entre X et 2 X molaires en sulfate d'ammonium à un pH donné, n'aura pas la même composition si par un traitement préalable on amène le milieu à la concentration X molaire en une ou en plusieurs étapes, éliminant le précipité formé à chaque stade.

Les caractères de relargage ne peuvent être considérés comme des constantes physiques rigoureuses que lorsqu'elles sont appliquées dans des conditions bien définies à des protéines purifiées. L'interprétation des résultats d'une expérience effectuée sur un mélange complexe de protéine doit donc être nuancée, c'est pourquoi nous préférons effectuer l'extraction phytique de fractions de protéines sériques obtenues par relargage. L'étude de ces extraits permet d'identifier les composants phytosolubles de ces fractions correspondant aux définitions que l'on trouve dans la bibliographie. A priori il n'en aurait pas nécessairement été de même si une solution d'extrait phytique du sérum avait été traitée par le sulfate d'ammonium. En effet lors de la défécation phytique

Des protéines et quelques glycoprotéines sont éliminées et en particulier les constituants pondéralement très importants (sérum-albumine, transferrine par exemple).

Avant d'effectuer la précipitation phytique d'une fraction, nous dialysons la préparation à 4° contre de l'eau distillée fréquemment changée pendant plusieurs jours. Nous avons vu que (troisième chapitre paragraphe V) le sulfate d'ammonium à partir de 0,08 M. inhibe la précipitation phytique et que de toute façon la force ionique en cations monovalents doit être contrôlée (septième chapitre, paragraphe II. B).

A. Fractionnement par le sulfate d'ammonium en trois étapes

Pour illustrer nos résultats nous allons décrire un schéma de fractionnement utilisé par SCHULTZE et coll. (176) pour l'étude des glycoprotéines solubles dans l'acide perchlorique 0,2 N. Par électrophorèse préparative sur chlorure de polyvinyle en milieu tamponné à pH 8,6, ces auteurs isolent la glycoprotéine β_2 de la fraction précipitée à pH 7 entre 1,4 et 1,8 M. en sulfate d'ammonium. De même la glycoprotéine acide α_2 est caractérisée dans la fraction relarguée entre 1,8 M pH 7,0 et 2,65 M. pH 5. Enfin du surnageant ils isolent la glycoprotéine acide α_1 et l'hémopexine.

Nous préparons les extraits phytiques de chacune des trois fractions obtenues par ce schéma de relargage pratiqué sur un sérum sanguin dilué au demi par une solution de chlorure de sodium à 9 g/l.

a- Identification des glycoprotéines phytosolubles dans la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium 1,8 M. pH 7,0.

On retrouve effectivement la glycoprotéine β_2 dans l'extrait phytique de la fraction précipitée entre 0 à 1,8 M. de sulfate d'ammonium à côté d'une petite quantité de globulines γ "A" (Figure N° 16, lames A et B).

On note également la présence d'une quantité notable d'une α_2 globuline non révélée par l'immunsérum.

Cet extrait est fractionné par filtration sur gel de dextrane (partie technique : chapitre IV. A). Une solution de 300 mg. de la préparation dans un tampon tris-hydroxyméthylamino-méthane (0,1 M), chlorure de sodium (1 M) de pH 8,0 est chromatographiée sur une colonne de Séphadex G 200 (50 cm x 2 cm). Le chromatogramme tracé par mesure de la densité optique à 2780 Å donne deux clochers d'importance sensiblement égale. L'étude de ces fractions montre (figure 16) que l' α_2 globuline dont nous avons signalé la présence, se partage entre les deux clochers du chromatogramme. Son poids moléculaire est donc de l'ordre de 50 000, ce qui permettrait de l'identifier à la glycoprotéine α_2 "HS" ($S_{20w} = 3,6$). Il ne peut s'agir ici de la glycoprotéine acide α_2 , dont le poids moléculaire est certes voisin, mais qui ne précipite que par le sulfate d'ammonium 2,0 à 2,8 M à pH 5,0 (voir tableau XII.)

L'étude électrophorétique de la fraction I de cette chromatographie met en évidence en plus de la globuline $\gamma_{"A"}$, déjà bien connue, un composant dans la zone α_1 de l'électrophorèse, et qui doit correspondre à une glycoprotéine de poids moléculaire relativement élevé. Il ne peut s'agir de la glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophane" (HAUPT 177) ni de la glycoprotéine α_1 "X" (SCHULTZE 178) qui ne précipitent que pour des concentrations plus élevées en sulfate d'ammonium. La postalbumine "4,6 S" pourrait se trouver dans cette fraction, mais elle ne peut être mise en évidence par les réactions immunochimiques (HEIDE 179). Or, le composant α_1 que nous cherchons à identifier est incontestablement un bon antigène (figure N° 16, lame H). Par élimination successive, et, en admettant que cette α_1 globuline soit déjà connue, il nous reste deux possibilités : l'inhibiteur de trypsine inter- α_1 - α

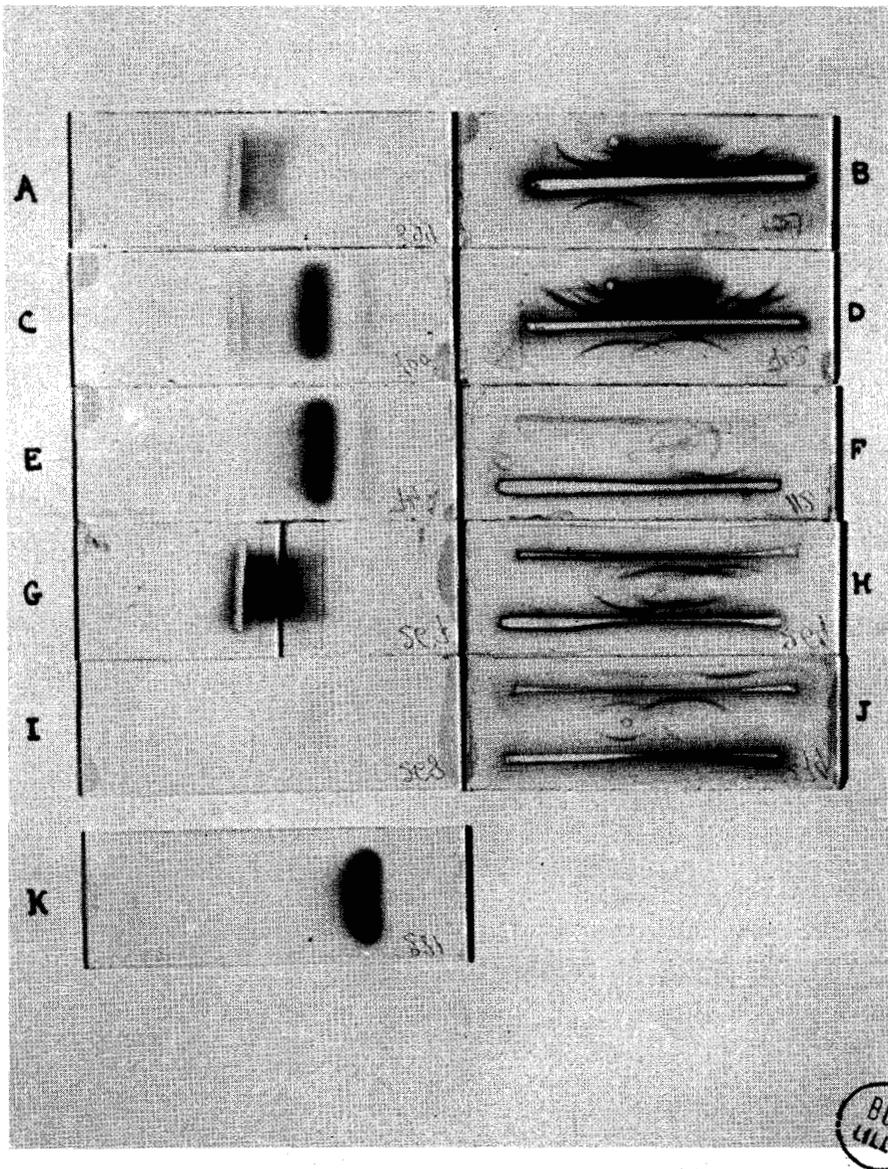


Figure N° 16 - Extraits phytiques des fractions obtenues par relargage par le sulfate d'ammonium.

- A et B ; fraction précipitée par le sulfate d'ammonium 1,8 M pH 7,0.
 C et D : fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre 1,8 M pH 7,0 et 2,65 M pH 5.
 E et F : Fraction soluble dans le sulfate d'ammonium 2,65 M pH 5,0.
 G, H, I et J : Fractionnement par chromatographie sur SEPHADEX G 200 de la première préparation (A et B).
 K : Isolement de la glycoprotéine acide α 1 par chromatographie sur C.M cellulose de la fraction soluble dans le sulfate d'ammonium 2,65 M pH 5,0 (E et F).

($S_{20w} = 6,4$ et relargage par le sulfate d'ammonium 1,7 à 1,9 M. pH 7,0 (HEIDE 180) ou la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable" ($S_{20w} = 3,8$ et relargage par le sulfate d'ammonium 1,5 à 2,0 M. pH. 7,0 (SCHULTZE 181). La mobilité anodique nous semble un peu trop importante pour une inter $\alpha_1 - \alpha_2$ globuline. Nous retiendrons donc de préférence la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable", d'autant plus que l'on trouve une faible quantité de composant α_1 dans la fraction II du chromatogramme, ce qui tendrait à lui attribuer un poids moléculaire voisin de 50 000.

Dans la fraction II du chromatogramme on retrouve la glycoprotéine β_2 ($S_{20w} = 2,9$) ainsi que le reste des glycoprotéine α_2 "HS" et glycoprotéine α_1 "aisément précipitable" que nous avons déjà signalé.

b- Identification des glycoprotéines phytosolubles dans la fraction des protéines sériques précipitées par le sulfate d'ammonium entre 1,8 M. pH 7,0 et 2,65 M. pH 5,0.

L'extrait phytique de cette fraction contient la préalbumine, la glycoprotéine acide α_1 ainsi qu'une très faible proportion d' α_2 et β_2 globulines. L'étude immuno-électrophorétique permet d'identifier la glycoprotéine β_2 . On peut envisager que l' α_2 glycoprotéine (arc 8 du diagramme immunoélectrophorétique) soluble dans l'acide perchlorique 0,2 M. précipitée par le sulfate d'ammonium 2,65 M. à pH 5,0, s'identifie soit à la glycoprotéine α_2 "GC" soit à la glycoprotéine acide α_2 (voir tableau N° XII).

c- Identification des glycoprotéines phytosolubles dans le surnageant après relargage par le sulfate d'ammonium 2,65 M. pH 5,0.

Dans l'extrait phytique de ce surnageant, on retrouve la préalbumine, la glycoprotéine acide α_1 et une α_2 -

glycoprotéine. L'électrophorèse sur papier à pH 3,9 confirme la présence de glycoprotéine acide α_1 et une chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose permet de l'isoler à l'état presque pur puisqu'elle ne contient plus qu'une trace de préalbumine et d'une autre α_1 glycoprotéine (figure 16).

De plus, l'immunochimie de cet extrait phytique met en évidence la présence de deux α_1 globulines. Or dans cette zone de relargage par le sulfate d'ammonium on ne connaît que la glycoprotéine α_1 "X" et l'anti trypsine α_1 .

CONCLUSIONS :

Cette expérience nous confirme les identifications que nous avons effectuées au cours des chapitres précédents. Elle nous permet en outre de faire progresser l'interprétation des diagrammes dans la zone α_1 et α_2 .

La caractérisation de la glycoprotéine α_2 "HS" semble à peu près définitive. Les glycoprotéines α_1 "aisément précipitable" et α_1 "X" figurent certainement parmi les composants mineurs de la zone post-albumine des extraits.

B. FRACTIONNEMENT EN SIX ETAPES :

Au cours d'une autre expérience, un relargage par le sulfate d'ammonium nous donne six fractions. L'étude immunochimique est illustrée dans la figure 17 et nous reproduisons l'interprétation dans le tableau XIII. Nous indiquons d'un signe (+) les composants identifiés par saturation d'un immunosérum et nous soulignons les composants déjà identifiés au cours des chapitres précédents.

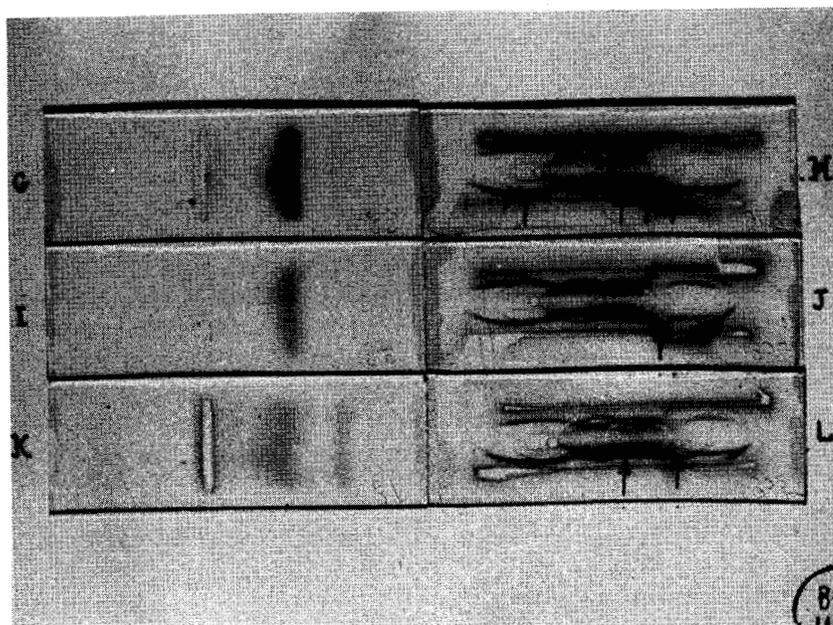
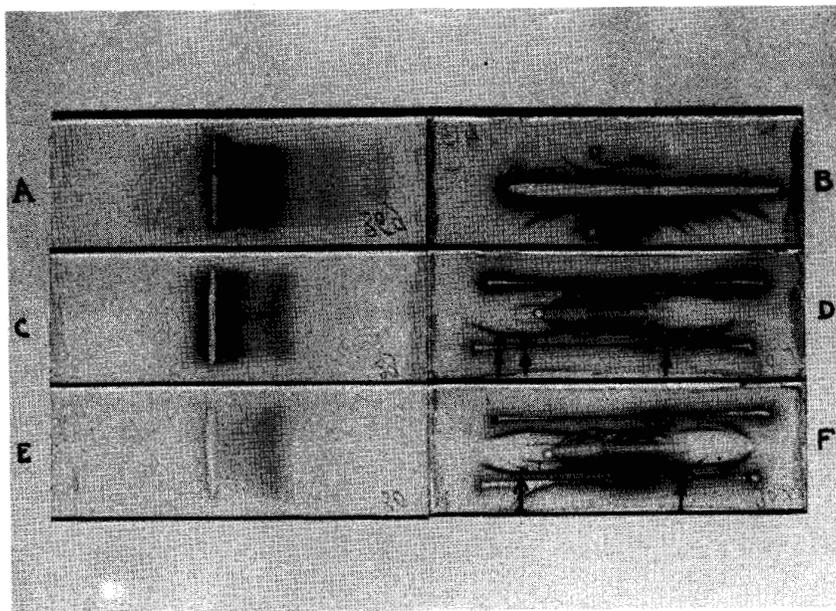


Figure N° 17 : FRACTIONNEMENT DES GLYCOPROTEINES PHYTOSOLUBLES PAR RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

Etude électrophorétique et immunochimique des fractions relargées par le sulfate d'ammonium :

- entre 0 et 1,3 M. pH 6,5 : A et B
- entre 1,3 et 1,6 M. pH 6,5 : C et D
- entre 1,6 et 2,0 M. pH 6,5 : E et F
- entre 2,0 et 2,5 M. pH 6,5 : G et H
- entre 6,5 et pH 3,5 (2,5 M) : I et J
- entre 2,5 M pH 3,5 et 4,0 M. pH 6,5 : K et L.

Donc, avec chacune de ces préparations nous saturons les anticorps d'un sérum de cheval immunisé contre toutes les protéines du sérum humain (partie technique : chapitre VII. D). L'immunoélectrophorèse du sérum sanguin révélée avec le réactif ainsi obtenu ne comporte plus les arcs correspondant aux protéines qui se trouvaient à une concentration convenable dans la préparation. Dans des conditions favorables de concentration relative en antigène et en anticorps il est possible de localiser sur une immunoélectrophorèse les arcs correspondants aux dérivés étudiés et surtout d'établir leur position relative par rapport aux autres arcs du schéma.

Malheureusement vu les grandes différences de concentrations des divers composants d'un extrait, et les très grandes différences d'antigénicité, il est impossible avec ce type d'expérience de faire un bilan exhaustif de la composition d'une préparation. Inversement les résultats positifs bien que forcément fragmentaires présentent le plus grand intérêt et peuvent dans une certaine mesure, être considérés comme une identification définitive.

Les globulines γ "A" (les globulines γ "G" révélées par suite de l'antigénicité croisée avec les globulines γ "A"), la glycoprotéine β_2 , le séromucoïde β_1 , l'anti-trypsine α_1 , la glycoprotéine acide α_1 et la préalbumine sont nettement caractérisées. La nature de la glycoprotéine α_2 "HS" et de la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable" paraît confirmée. Un choix persiste quant à l'identification soit avec l'inhibiteur de trypsine inter α_1 - α_2 , soit avec la glycoprotéine acide α_2 , soit encore avec la glycoprotéine α_2 "GC". Il en est de même pour l'identification d'une α_1 glycoprotéine qui peut correspondre par sa zone de relargage à la glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophane". Pour deux des composants (inhibiteur de trypsine inter α_1 - α_2 et la glycoprotéine α_2 "HS"

les modifications du diagramme immunoélectrophorétique obtenu par saturation de l'immunsérum sont minimales et difficilement interprétables. Nous les avons marqués dans le tableau XIII. du signe (+).

A ce stade de notre travail nous pouvons néanmoins proposer une identification fondée sur plusieurs éléments acquis à partir de techniques expérimentales différentes et que nous avons rassemblés dans le tableau XIV. La confrontation de ces résultats avec les propriétés^{des} différentes glycoprotéines rapportées dans le tableau XII nous permet de proposer une nomenclature du diagramme immunoélectrophorétique de la figure 11.

Cette synthèse nous montre l'incertitude qui persiste sur l'identité d'une α_2 glycoprotéine (arc 8 du diagramme) et de deux α_1 glycoprotéines (arcs 5 et 6). Pour tenter de préciser ces données encore incomplètes un fractionnement complémentaire a été pratiqué et son étude réalisée par électrophorèse sur gel d'amidon. Nous nous attacherons plus particulièrement dans cette étude à l'analyse des composants relargués par le sulfate d'ammonium entre 1,8 et 2,5 M. ainsi qu'à vérifier les caractères de solubilité dans le Rivanol des α_2^- glycoprotéines de cette préparation.

C. FRACTIONNEMENT COMPLEMENTAIRE POUR LA CARACTERISATION DES α GLYCOPROTEINES.

Comme nous venons de le voir, les constituants majeurs de l'extrait phytique sont maintenant identifiés. Par contre certains composants mineurs, et particulièrement les α_1 et α_2 glycoprotéines nécessitent encore la recherche d'autres critères pour leur identification. L'étude immunoélectrophorétique est délicate car ces constituants n'existent qu'à l'état de traces et ne sont qu'irrégulièrement révélés par les immunsérums. Les mobilités électrophorétiques étant très

Glycoprotéines phytosolubles précipitées par sulfate d'am- monium.	Lames cor- respondantes sur figure N°17	Glycoprotéines identifiées.
0 à 1,3 M. pH 6,5	A et B	Globulines χ_A (+) Globulines χ_G (+) Glycoprotéine β_2 (+) Glycoprotéine α_2 "HS" (+)
1,3 à 1,6 M. pH 6,5	C et D	Inhibit. trypsine inter α_1 α_2 (+) Glycoprotéine α_1 "aisément pré- α_1 cipitable"
1,6 à 2 M. pH 6,5	E et F	
2 à 2,5 M. pH 6,5	G et H	Seromucoïde β_1 (+) Glycoprotéine acide α_2 (+) Glycopr. Glycopr. α_1 "X" α_1 pauvre tryptop.
2,5 M. pH 6,5 à 3,5	I et J	Préalbumine Antitrypsine α_1 (+)
2,5 à 4 M. pH 3,5 à 6,5	K et L	Glycopr. acide α_1

Tableau XIII. - Identification des glycoprotéines phytosolubles dans les fractions relarguées par le sulfate d'ammonium.
 (+) : caractérisée par saturation d'un immunosérum. (figure N° 17)
 (+) : caractérisation hypothétique par saturation d'un immunosérum
 (souligné) : caractérisée par d'autres méthodes au cours des chapitres précédents.

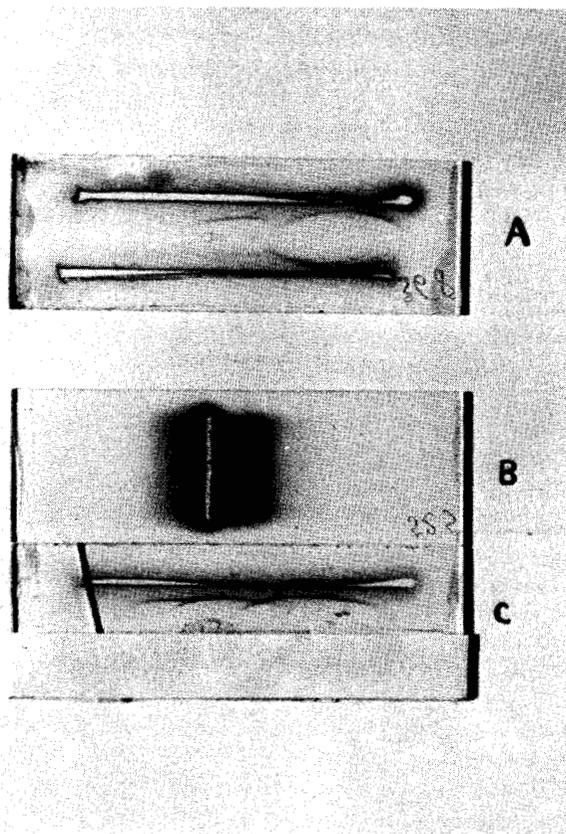


Figure N° 18 - Extrait phytique de fractions obtenues par relar-
gage par le sulfate d'ammonium.

A - Fraction soluble dans le sulfate d'ammonium
1,4 M à pH 5,0.

B et C ; Fraction précipitée par le sulfate d'am-
monium 1,45 M entre pH 6,5 et 5,0.

voisines, les zones du protéinogramme sont le plus souvent confondues. Dans les conditions optimales on peut mettre en évidence plusieurs constituants comme le montre la figure N° 18 lame A. Un des immunosérums révèle indiscutablement trois globulines α_1 solubles dans le sulfate d'ammonium 1,45 M. à pH 5 et dans l'acide phytique à pH 2,1.

Pour obtenir cette fraction nous avons éliminé successivement le précipité obtenu en présence de 1,45 M. de sulfate d'ammonium à pH 6,5, puis celui formé par acidification du milieu à pH 5,0. Dans les extraits phytiques de ces fractions on identifie une trace de globulines γ_{G} , les globulines γ_{A} , la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable" et la glycoprotéine α_2^{HS} (figure 18, lames B et C). Ces composants sont aisément caractérisés dans le diagramme de l'électrophorèse en gel d'amidon qui révèle en outre un composant mineur, plus rapide que la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable" et occupant donc sensiblement la position de la glycoprotéine acide α_1 . Il ne peut s'agir de cette dernière car la glycoprotéine étudiée précipite par le sulfate d'ammonium entre 1,3 et 1,8 M. L'existence de cette glycoprotéine n'a été signalée dans aucun type de fractionnement et nous ne pouvons actuellement proposer une nomenclature pour ce composant qui semble bien correspondre à une entité nouvelle caractérisable parmi les glycoprotéines phytosolubles facilement précipitées par le sulfate d'ammonium.

La fraction suivante (relargage par le sulfate d'ammonium de 1,45 à 1,8 M. à pH 5,0) correspond essentiellement à la glycoprotéine β_2 encore souillée de globuline γ_{A} .

C'est la suite de ce fractionnement qui va nous permettre d'étudier les constituants mineurs de mobilité α_1 et α_2 à l'électrophorèse. En effet, l'immunoélectrophorèse

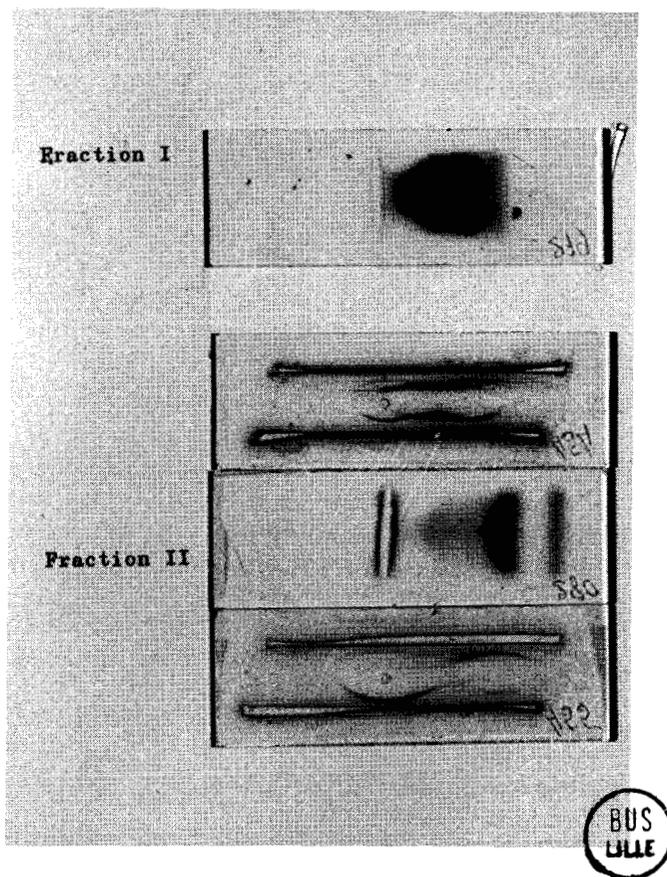


Figure N° 19 - Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique. des fractions séparées en chromatographie sur Sephadex G 200 à partir de la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre 1,8 M à pH 5,0 et 2,4 M à pH 6,5.

caractérise au moins cinq de ces glycoprotéines dans l'extrait phytique du produit de relargage par le sulfate d'ammonium de 1,8 M. pH 5,0 à 2,4 M. pH 6,5 et quatre ou cinq arcs de précipitation sont obtenus dans l'étude de l'extrait phytique des glycoprotéines précipitées par le sulfate d'ammonium entre 2,4 et 3,2 M. à pH 5,0.

I.- Etude des glycoprotéines phytosolubles précipitées par le sulfate d'ammonium de 1,8 M. pH 5,0 à 2,4 M. pH 6,5.

L'électrophorèse en gel d'amidon de cette préparation met en évidence sept constituants différents. Rappelons que l'immunoélectrophorèse ne caractérise que cinq arcs de précipitation. Cet extrait, chromatographié sur une colonne de Séphadex G 200 (partie technique : chapitre IV. A) nous donne deux fractions.

La première de ces fractions, quantitativement la plus importante est riche en composants de la zone α_2 et β du protéinogramme. La zone α_1 est faible mais nettement visible (figu 19). L'étude immunochimique révèle la présence d'une α_2 glycoprotéine, du séromucoïde β_1 et de trois composants α_1 et α_1 "lents". En supposant toujours que nous sommes en présence de glycoprotéines connues et en tenant compte des poids moléculaires, on peut admettre que cette fraction contient :

- Inhibiteur de trypsine inter α_1 - α_2 ($S_{20w} = 6,5$).
- La glycoprotéine α_1 "X" ($S_{20w} = 5,0$)
- ainsi qu'une faible quantité d'antitrypsine α_1 .

La postalbumine 4,6 S pourrait également se trouver dans cette fraction, mais nous avons déjà vu que nous ne disposons d'aucun moyen immunochimique pour l'identifier (HEIDE 182). La nature de l' α_2 glycoprotéine ne peut encore être précisée la glycoprotéine α_2 "GC" et la glycoprotéine acide α_2 ayant des poids moléculaires voisins et un comportement analogue en Séphadex G 200.

Tableau XIV. Synthèse des résultats obtenus dans la caractérisation des composants de l'extrait phytylique.

Arc de précipit. identifié dans l'étude immunoélectrophorétique.	Zone de relargage au sulfate d'ammonium	Riva ol 0,84p.100 pH 8,0	Cl $0,4$ H $0,2$ N	Identification proposée
- Préalbumine arc 1	2 M. pH 6,5 à 2,5 M pH 3,5	+	±	Préalbumine
- α_1 globulines arc 2	2,5 M. pH 3,5 à 4,0 M.	-	-	Glycop. acide α_1
arc 3	2,5 M pH 6,5) 4,0 M.	-	-	Antitrypsine α_1
arc 4	0 à 1,6 M. pH 6,5	+	+	Glycop. α_1 "aisément précipitable".
arc 5	2 M pH 6,5 à 2,5 M pH 3,5	+	+	Glycop. α_1 "X"
arc 6	2 M pH 6,5 à 2,5 M pH 3,5	+	+	Glycop. α_1 "pauvre en tryptophane". Inhibiteur de trypsine inter α_1 α_2
- α_2 globulines arc 7	1,3 M à 1,6 M pH 6,5	-	-	Glycop. α_2 "HS"
arc 8	2 M pH 6,5 à 2,5 M pH 3,5	+	-	Glycop. α_2 "GC" Glycop. acide α_2
- β_1 globuline arc 9	2 M à 4 M pH 6,5	-	-	Séromucoïde β_1
- β_2 globuline arc 10	1,3 M à 2 M pH 6,5	-	-	Glycop. β_2
arc 11	1,3 M à 2 M pH 6,5	±	+	Globulines γ "A"

(+) : précipité par le réactif.

(-) : soluble dans le réactif.

Le protéinogramme de la deuxième fraction de cette chromatographie sur Sephadex G 200 se présente de façon toute différente. On y voit (figure 19) la préalbumine, une α_1 glycoprotéine "assez rapide", une faible quantité d' α_2 glycoprotéine et enfin une trace de β_2 glycoprotéine. On y caractérise en immunoélectrophorèse deux α_1 glycoprotéines dont l'une s'identifie avec l'antitrypsine α_1 , la seconde, différente de l' α_1 -glycoprotéine signalée dans la première fraction, pourrait être la glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophane" ($S_{20w} = 3,3$). Le composant mineur de la zone α_2 , identique à celui que nous avons trouvé dans la première fraction, peut correspondre à la glycoprotéine acide α_2 ou à la glycoprotéine α_2 "GC" ($S_{20w} = 3,7$) dont le poids moléculaire est insuffisant pour que l'on puisse espérer la retrouver intégralement dans la première fraction.

2. Etude des glycoprotéines phytosolubles précipitées par le sulfate d'ammonium entre 2,4 M et 3,2 M pH 5,0.

L'immunoélectrophorèse caractérise dans cette préparation deux α_1 glycoprotéines, une α_2 glycoprotéine majeure une trace de séromucoïde β_1 et de globulines δ "A". L'électrophorèse en gel d'amidon (figure 20) permet d'identifier deux composants majeurs : la glycoprotéine acide α_1 et un composant analogue à l' α_2 glycoprotéine identifiée dans la fraction précédente. On confirme en outre la présence de globulines δ "A" donnant une trainée diffuse dans la zone $\alpha\beta$ du diagramme et un grand nombre de composants mineurs : préalbumine, l'antitrypsine α_1 , la glycoprotéine α_1 "x" la glycoprotéine α_1 "pauvre en tryptophane", le séromucoïde β_1 .

La richesse de cette préparation en α_2 glycoprotéine permet d'assimiler ^{celle-ci} à la glycoprotéine acide α_2 précipitée entre 2,0 et 2,8 M. en sulfate d'ammonium à pH 5,0 (tableau XII)

ce qui la différencie de la glycoprotéine α_2 "GC" qui précipite entre 2,0 et 2,4 M. en sulfate d'ammonium à pH 5,0. En faveur de cette identification, nous pouvons également retenir sa localisation dans le diagramme d'électrophorèse en gel d'amidon où la glycoprotéine α_2 "GC" appartient au groupe des post-albumines du sérum humain, tandis que la glycoprotéine acide α_2 possède une mobilité électrophorétique légèrement supérieure à celle du séromucoïde β_1 .

Ces résultats complètent l'identification des α_1 et α_2 glycoprotéines phytosolubles. L'intérêt de l'électrophorèse en gel d'amidon pour la caractérisation des glycoprotéines mineures du sérum sanguin y apparaît d'une manière évidente (figure 20).

CONCLUSIONS DU DIXIEME CHAPITRE :

L'application des divers fractionnements à la caractérisation des glycoprotéines phytosolubles, nous fait progresser dans notre travail d'identification de celles-ci.

Les résultats de l'extraction perchlorique nous permettent d'établir que la plupart des composés phytosolubles se retrouvent dans l'extrait perchlorique 0,2 N. L'utilisation du Rivanol comme agent de précipitation de certaines α_1 et α_2 glycoprotéines oriente leur identification.

L'électrophorèse préparative en veine liquide nous apporte une caractérisation définitive pour la préalbumine, la glycoprotéine acide α_1 , l'antitrypsine α_1 , l'hémopexine et la glycoprotéine β_2 .

La filtration sur gel de dextrane nous fournit un fractionnement en fonction du poids moléculaire nous permettant de proposer des hypothèses d'identification pour le groupe des

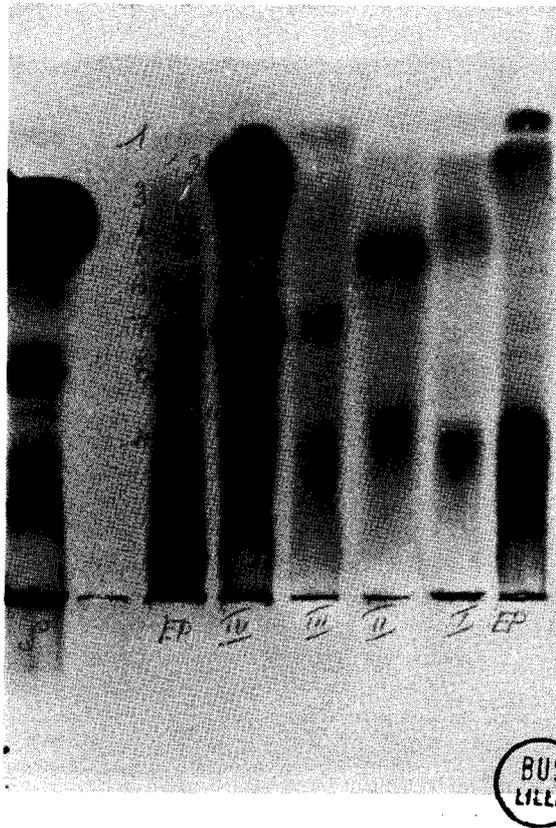


Figure N° 20 : Etude électrophorétique en gel d'amidon vertical
(tampon tris-borate-EDTA, pH 8,9)

- S Sérum humain
- E.P Fraction soluble dans l'acide phytique
- I Précipité obtenu par le sulfate d'ammonium 1,45 M à pH 6,5
- II Précipité obtenu par le sulfate d'ammonium 1,45 M de pH 6,5 à pH 5,0
- III Précipité obtenu par le sulfate d'ammonium entre 1,8 M et 2,4 M à pH 6,5
- IV Précipité obtenu par le sulfate d'ammonium entre 2,4 M et 3,2 M à pH 5,0.
- 1 Préalbumine
- 2 Glycoprotéine acide α_1
- 3 α_1 -antitrypsine
- 4 α_1 -glycoprotéine "aisément précipitable"
- 5 α_2 "HS" glycoprotéine
- 6 α_1 "X" glycoprotéine
- 7 α_2 - glycoprotéine acide
- 8 Séromucoïde β_1
- 9 Inhibiteur de la trypsine inter $\alpha_1 \alpha_2$
- 10 β_2 glycoprotéine
- 11 γ "A" globuline.

post-albumines. Enfin le relargage par le sulfate d'ammonium nous confirme les caractérisations antérieures et nous donne un nouveau faisceau d'arguments pour l'étude des glycoprotéines mineures de l'extrait phytique. Nous pouvons maintenant faire un bilan général des résultats de cette étude des constituants phytosolubles.

- O N Z I E M E C H A P I T R E -
=====

BILAN GENERAL DE L'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DE
L'EXTRAIT PHYTIQUE.

Nous avons vu au cours des chapitres précédents que l'identification des glycoprotéines est facile lorsque l'on dispose d'une réaction de caractérisation spécifique, ou lorsque l'on possède un élément de référence (glycoprotéine pure ou immunsérum monospécifique). Dans les autres cas, malheureusement les plus nombreux, nous devons faire appel aux propriétés physicochimiques de ces glycoprotéines. L'identification est alors beaucoup plus complexe, et les conclusions sont rarement définitives.

Ceci est d'autant plus vrai que mis à part les quelques composants majeurs, actuellement bien connus, l'étude des glycoprotéines quantitativement mineures ne fait que débiter. Pour la plupart d'entre elles, on ne les connaît que depuis moins de cinq ans et seuls quelques rares laboratoires ont pu les isoler à l'état relativement pur. Les données physicochimiques qui sont généralement admises sont parfois bien fragiles.

Certains de ces composants n'existent dans le sérum qu'à des taux extrêmement faibles (quelques dizaines de milligrammes par litre) et leur isolement en quantité suffisante

entraîne des difficultés matérielles, encore aggravées par le fait qu'il faut diluer le sérum avant toute extraction. Enfin, il ne faut pas oublier que la manipulation de plusieurs dizaines de litres de préparations, pendant plusieurs semaines, ne peut se faire sans risque d'y apporter quelques souillures (par les papiers filtres et la cellophane par exemple). Toute souillure adialysable se retrouve comme constituant mineur dans la poudre lyophilisée. Ces considérations prennent toutes leurs importances quand on connaît la remarquable sensibilité des techniques immunochimiques, et nous incite à une certaine prudence dans l'étude des glycoprotéines ne figurant qu'à l'état de traces dans l'extrait phytique. Par contre, pour les glycoprotéines plus connues et présentes dans le sérum à des concentrations relativement élevées (plus de 100 mg/l.) les caractérisations sont plus aisées.

C'est ainsi que la préalbumine (SCHULTZE 183-184) a été isolée par électrophorèse préparative en veine liquide (dixième chapitre, paragraphe III) et caractérisée par sa grande mobilité électrophorétique à pH 8,2, sa faible teneur en hexoses combinés et surtout sa forte teneur en tryptophane. Elle correspond indiscutablement à l'arc N° 1 de la figure n° II.

La glycoprotéine acide α_1 (WEIMER 185, SMITH 186 et SCHMID 187) (arc N° 2), pondéralement le constituant le plus important de l'extrait phytique, est identifiée par sa mobilité électrophorétique à pH 3,9, sa colorabilité intense par le réactif de SCHIFF après oxydation par l'acide périodique et sa solubilité dans le Rivanol 0,84 p. 100 à pH 8,0. Elle a été isolée à l'état presque pur par relargage au sulfate d'ammonium et chromatographie sur carboxyméthylcellulose (Dixième chapitre : V. Ac).

L'antitrypsine α_1 (arc N° 3) (BUNDY 188 et SCHULTZE 189-190) est facilement identifiable par les immunosérums, par relargage au sulfate d'ammonium et par sa solubilité dans l'acide perchlorique 0,2 N.

Le groupe des post-albumines apparaît plus complexe. Sa caractérisation définitive ne peut être obtenue que par électrophorèse en gel d'amidon. Nous bénéficions toutefois pour l'identification de ces glycoprotéines des caractères de précipitation fort différents par le sulfate d'ammonium de deux α_1 glycoprotéines mineures (arcs N° 4 et 5) : la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable" dans le sulfate d'ammonium (SCHULTZE 191) et la glycoprotéine α_1 "X" soluble dans le sulfate d'ammonium 2 M. (SCHULTZE 192) et caractérisée par son poids moléculaire relativement important ($S_{20w} = 5$).

La confrontation des résultats obtenus par relargage au sulfate d'ammonium et par chromatographie de filtration sur Sephadex G. 200 nous conduisent à identifier la troisième alpha glycoprotéine (arc n° 6) caractérisée en immunoelectrophorèse à une glycoprotéine de mobilité intermédiaire à celles de α_1 et α_2 globulines, de constante de sédimentation assez importante ($S_{20w} = 6,4$) et décrite sous le nom d'inhibiteur de trypsine inter $\alpha_1 - \alpha_2$ (HEIDE 193). Sa position dans le diagramme d'électrophorèse en gel d'amidon (Zone $\alpha\beta$) confirme cette interprétation.

L'arc N° 7 de la figure N° 11 correspond à la glycoprotéine α_2 "HS" (SCHULTZE 194) caractérisée dans les fractions précipitées par le sulfate d'ammonium 1,6 M. pH 6,5 et par son poids moléculaire voisin de 50 000. (Dixième chapitre : V - A. a). Sur électrophorèse en gel d'amidon on la retrouve bien à l'extrémité cathodique de la zone post-albumine. Par immunoelectrophorèse d'un extrait phytique du sérum sanguin il est difficile de la différencier de la glycoprotéine acide α_2 .

(arc N° 8) (SCHULTZE 195). On peut toutefois caractériser cette dernière dans les fractions obtenues par relargage au sulfate d'ammonium à des concentrations supérieures à 2M. et sa précipitation dans le Rivanol 0,84 p. 100 pH 8,0 (Dixième chapitre II, V - A c et V. D). En électrophorèse sur gel d'amidon on la retrouve bien dans la zone β globulinique.

Le séromucoïde β_1 (arc N° 9) (BISERTE 196-197, SCHULTZE 198) (GRABAR 199) est mis en évidence par sa propriété de fixer le cytochrome c (Neuvième chapitre). On le retrouve par électrophorèse préparative en veine liquide (dixième chapitre - V. B) et dans les fractions solubles dans le Rivanol 0,84 p. 100 pH 8,0 (dixième chapitre : II). En électrophorèse sur gel d'amidon elle occupe la zone " β ".

La glycoprotéine β_2 (arc N° 10 (SCHULTZE 200) est bien identifiée par saturation d'un immunsérum (sixième chapitre V : B). On la retrouve dans toutes les fractions de relargage par le sulfate d'ammonium 1,8 M et dans la zone " α lente" de l'électrophorèse sur gel d'amidon. Grâce à son faible poids moléculaire on la met en évidence dans les dernières fractions d'une chromatographie de filtration sur gel de dextrane (dixième chapitre : IV).

Les globulines γ "A" (arc N° 11) (HERMAN 201) sont identifiées par un immunsérum monospécifique, et par saturation d'un immunsérum (dixième chapitre : V. B). On la retrouve dans les fractions précipitées par une concentration en sulfate d'ammonium inférieure à 2,0 M. Grâce à son poids moléculaire élevé on la localise dans les premières fractions d'une chromatographie par filtration sur gel de dextrane (dixième chapitre : IV) Enfin, nous avons prouvé que sa solubilité dans le Rivanol 0,84 p. 100 pH 8,0 n'est que relative, une proportion non négligeable se retrouve dans le précipité (dixième chapitre : III).

Nous avons enfin établi (septième chapitre) que les globulines γ "G" devaient être considérées comme partiellement phytosolubles.

Cette interprétation essentiellement fondée sur les caractéristiques fondamentales des glycoprotéines du sérum humain actuellement décrites ne suffit pas toutefois à expliquer la totalité des résultats expérimentaux obtenus dans l'étude des glycoprotéines phytosolubles. L'électrophorèse en gel d'amidon caractérise en effet un composant mineur, plus rapide que la glycoprotéine α_1 "aisément précipitable", que nous obtenons par les mêmes conditions de relargage par le sulfate d'ammonium. Deux pré-albumines sont visibles sur le diagramme d'électrophorèse sur gel d'agar réalisé sur l'extrait phytique total du sérum obtenu en milieu desionisé (figure 10). Ces résultats posent le problème de l'existence d'autres glycoprotéines mineures actuellement non isolées et présentes dans ce groupe des glycoprotéines phytosolubles.

- D O U Z I E M E C H A P I T R E -

APPORT DE L'ACIDE PHYTIQUE COMME REACTIF DANS L'ETUDE
DES GLYCOPROTEINES DU SERUM.

L'isolement et la préparation des glycoprotéines du sérum sanguin présentent un certain nombre de difficultés. La défécation perchlorique, qui est actuellement la méthode la plus répandue, n'est absolument pas sélective. En effet, il n'existe pas de zone bien tranchée entre les protéines perchlorosolubles et celles qui précipitent par ce réactif. Comme le montre SCHULTZE (202) pour une concentration de 0,2 N en acide perchlorique, certaines glycoprotéines sont partiellement solubles, alors que pour 0,6 N, seule la glycoprotéine

acide α_1 se retrouve en totalité dans le surnageant. Assez souvent une faible quantité de sérumalbumine échappe à la défécation perchlorique (DE VAUX SAINT CYR 203-204). Enfin ce réactif donne lieu à des dénaturations et l'on peut se demander parfois si la perchlorosolubilité correspond à l'absence de combinaison avec l'acide perchlorique ou bien à une résistance à la dénaturation.

L'acide phytique au contraire réagit essentiellement par combinaison ionique avec les protéines. C'est un acide assez faible, et les réactions sont totales pour des faibles normalités de cet acide (0,01 N). Les préparations obtenues ne subissent que très peu de dénaturation et il est même possible d'effectuer les manipulations à la température du laboratoire. L'excès d'acide phytique dialyse assez facilement au travers d'une membrane de cellophane et se trouve éliminé avec les sels minéraux.

De plus, dans les conditions optimales le pH et de force ionique, la solubilité dans l'acide phytique semble être une propriété de certaines glycoprotéines alors que d'autres comme l'haptoglobine, la transferrine et la céruléoplasmine sont toujours précipitées. Enfin, nous retrouvons dans les extraits phytiques certaines glycoprotéines perchlorosolubles mais précipitées par l'acide trichloracétique.

La phytosolubilité est indépendante des caractères de précipitation par le Rivanol et par le sulfate d'ammonium, ainsi que de la mobilité électrophorétique et du volume moléculaire. On peut donc envisager la défécation phytique comme stade intermédiaire dans l'isolement de ces glycoprotéines.

- C o n c l u s i o n s g é n é r a l e s -

Dans les premiers chapitres nous avons passé en revue les propriétés physico-chimiques de l'acide phytique, ce qui nous a permis une définition de l'équivalent gramme de celui-ci. Nous avons ensuite envisagé le mode de réaction de l'acide phytique avec les protéines, ce qui nous a amené à définir "l'indice de combinaison phytique" d'une protéine, La mesure de cet indice sur des précipités obtenus dans des conditions variables nous a précisé l'influence de certains facteurs sur la précipitation phytique de diverses protéines.

Par précipitation phytique des fractions de protéines sériques séparées par électrophorèse préparative en film liquide, nous avons prouvé l'hétérogénéité des composants phytosolubles, qui se répartissent assez régulièrement sur tout le tracé du protéinogramme.

Dans la suite du travail nous nous sommes attachés à l'étude qualitative et quantitative des constituants phytosolubles, ce qui nous a permis de les rattacher au groupe des glycoprotéines.

Par une étude électrophorétique de divers extraits phytiques obtenus dans des conditions variables nous avons mis en évidence l'influence du pH et de la force ionique sur la phytosolubilité de certaines protéines et en particulier celle des globulines du système X. Les résultats de ces expériences nous ont permis de définir les conditions optimales pour la préparation de l'extrait phytique du sérum sanguin et aussi de préciser les causes d'erreurs éventuelles.

Par l'étude immunochimique nous avons pu caractériser une douzaine de glycoprotéines dans un extrait phytique total du sérum. L'application des quelques rares réactions spécifiques actuellement disponibles nous a permis d'identifier la glycoprotéine acide α_1 et le séromucoïde β_1 .

Pour les autres constituants nous avons appliqué différentes techniques de fractionnement, de relargage et de précipitation afin d'identifier les divers composants par comparaison de leurs caractères physico-chimiques avec ceux actuellement admis pour les glycoprotéines connues. Le bilan de cette identification a été effectué au cours du onzième chapitre. Nous y résumons les arguments qui nous permettent de proposer une liste des glycoprotéines phytosolubles :

- La préalbumine
- la glycoprotéine acide α_1
- L'antitrypsine α_1
- La glycoprotéine α_1 "aisément précipitable".
- La glycoprotéine α_1 "X"
- L'inhibiteur de trypsine inter $\alpha_1 - \alpha_2$
- La glycoprotéine α_2 "HS"
- La glycoprotéine acide α_2
- Le séromucoïde β_1
- La glycoprotéine β_2
- les globulines γ "A"
- les globulines γ "G"

Nous devons également envisager l'existence d'une autre préalbumine et d'une α_1 glycoprotéine non encore décrites. Enfin, la défécation par l'acide phytique représente une excellente technique de préparation pour certaines glycoprotéines du sérum et surtout permet d'éliminer d'une préparation la totalité des holoprotéines.

- B I B L I O G R A P H I E -

Les numéros entre parenthèses qui suivent les références correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.

- ANDERSON R.J.
J. Biol. Chem. 1914, 17, 141 (27-78-91)
- ANDERSON R.J.
J. Biol. Chem. 1914, 17, 151 (28-79-92)
- ANDERSON R.J.
J. Biol. Chem. 1914, 17, 171 (29-46-48)
- BARRE R.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1473 (7-100)
- BARRE R.
Thèse Doct. Sci. Paris 1953, (8, 13, 17, 19, 22, 96, 101)
- BARRE R. et COURTOIS J.E.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 921 (15)
- BARRE R. et COURTOIS J.E.
Ann. Pharm. Fr. 1953, II, 653 (102)
- BARRE R. et COURTOIS J.E.
Ann. Pharm. Fr. 1954, 12, 601 (14)
- BARRE R. - COURTOIS J.E. - DELRIEU P. et PERLES R.
Ann. Biol. Clin. 1954, 12, 501 (16-98)
- BARRE R. - COURTOIS J.E. et WORMSER G.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 455 (23-24-88-95)
- BARRE R. et LABAT J.
Ann. Biol. Clin. 1959, 17, 309 (35-103)
- BARRE R. et LABAT J.
Ann. Biol. Clin. 1960, 18, 409 (36-104)

- BARRE R. et WORMSER G.
Ann. Pharm. Fr. 1955, 13, 736 (9)
- BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39 supp III, 93 (161)
- BISERTE G. - BRETON A. - HAVEZ R. - FONTAINE G.
Lille Médical 1958, 3, 3 (162)
- BISERTE G. - HAVEZ R. - HAYEM A. et LATURAZE J.
C.R. Acad. Sci. 1960, 250, 418 (143-169-196)
- BISERTE G. - HAVEZ R. - LATURAZE J. et HAYEM LEVY A.
Clin. Chim. Acta 1961, 6, 833 (144-197)
- BISERTE G. - LATURAZE J. et HAVEZ R.
Path. et Biol. 1951, 9, 17 (155)
- BLIX G. - TISELIUS A. et SVENSSON H.
J. Biol. Chem. 1941, 37, 485 (115)
- BOURQUELOT E. et HERISSEY H.
J. Pharm. Chim. 1911, 3, 145 (38)
- BROWN E.C. - HEIT M.L. et RYAN D.E.
Can. J. Chem. 1961, 39, 1290 (73-77-87-90)
- BUNDY H.F. et MEHL J.W.
J. Biol. Clin. 1959, 234, 1124 (125-188)
- BURGI W. et SCHMID K.
J. Biol. Chem. 1961, 236, 1066 (141)
- BYWATERS H.W.
Biochem .Z. 1909, 15, 322 (152)
- CANALS E. - MARIGNAN R. et CORDOER S.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1015 (42)
- CHABRE L.
Thèse Doct. Pharm. Paris 1959 (32-167).

- COURTOIS J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1945, 27, 411 (57)
- COURTOIS J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29, 944 (58)
- COURTOIS J.
Biochim. Biophys. Acta 1947, I, 270 (59)
- COURTOIS J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, 37 (60)
- COURTOIS J.E.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1075 (39)
- COURTOIS J.E. et AGNERAY J.
Ann. Biol. Clin. 1961, 19, 91 (74-99)
- COURTOIS J.E. et AGNERAY J.
Ann Biol. Clin. 1961, 19, 101 (76)
- COURTOIS J.E. et BARRE R.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 913 (6)
- COURTOIS J.E. et BARRE R.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 740 (12)
- COURTOIS J. et JOSEPH G.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, 610 (53)
- COURTOIS J.E. - MALANGEAU P. et CHABRE J.L.
C.R. Soc. Biol. 1959 153, 959 (31)
- COURTOIS J.E. - MALANGEAU P. et CHABRE J.L.
Ann. Pharm. Fr. 1959, 17, 561 (34)
- COURTOIS J.E. - MALANGEAU P. et CHABRE J.L.
Proc. Fourth. Int. Congress. Clin. Chem.
Edinburgh p. 167 Livingstone. Edit. Eding. et
Londres 1961 (33)

- DELRIEU P.
Thèse Pharm. Paris 1958 (30)
- DESJOBERT A et PETEK F.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 871 (55)
- FISCHLER F. et KURTEN F.
Biochem. Z. 1932, 254, 138 (84)
- FLEURY P.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1946, 28, 282 (49)
- FLEURY P. et COURTOTS J.
Biochim. Biophys. Acta 1947, 1, 256 (50-56)
- FONTAINE T.D. - PONS W.A. et IRVING G.W.
J. Biol. Chem. 1946, 164, 487 (5)
- FRAENKEL-CONRAT H. - BRANION B.A. et OLCOTT S.H.
J. Amer. Chem. Soc. 1946, 68, 34 (20)
- FRAENKEL-CONRAT H. - BRANION B.A. et OLCOTT S.H.
J. Biol. Chem. 1947, 168, 99, (21)
- GRABAR P. - VAUX SAINT CYR Ch. de et CLEVE H.
Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 853 (146-199)
- HAVEZ R.
Thèse Doct. Médecine Lille 1956 (163-166)
- HART E.B. et TOTTINGHAM W.E.
J. Biol. Chem. 1909, 6, 431 (47)
- HAUPT H. et HEIDE K.
Clin. Chim. Acta 1964, 10 555 (119-177)
- HEIDE K. et HAUPT H.
Behringwerk Mitt, 1964, 43, 161 (180-193)
- HEIDE K. - HAUPT H. et SCHULTZE H.E.
Nature 1964, 201, 1218 (165-182)

- HEIMBURGER N. - HEIDE K. - HAUPT H. et SCHULTZE H.E.
Clin. Chim. Acta 1964, 10, 293 (175)
- HELLOT R. et MACHEBOEUF M.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29, 817 (10)
- HEREMANS J.F.
Les globulines sériques du système gamma.
Arscia Edit. Brussel (1960) (148-150-151-201)
- HERMAN-BOUSSIER G.
Thèse Doct. Sci. Paris, 1960 (135)
- HEUBNER W. et STADLER H.
Biochem. Z. 1914, 64, 422 (65)
- HEWITT L.F.
Biochem. J. 1938, 32, 1554 (117)
- HIRSCHFELD J.
Nature 1960, 187, 126 (128)
- HIRSCHFELD J.
Science Tools. 1961, 8, 17, (129)
- HIRSCHFELD J. - JONSSON B. et RASMUSSEN M.
Nature 1960, 185, 931 (130)
- HOREJSI J. - SMETANA R.
Acta Med. Scand. 1956, 155, 65 (157)
- JAYLE M.F. et BOUSSIER G.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 959, (133)
- JAYLE M.F. et GILLARD P.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 149 (134)
- KUNKEL H.G.
The Plasma Proteins (PUTNAM F.W.) Vol 1 Chap. 8
Academic Press. N.Y. et Londres 1960 (164)

- KRAWKOW N. Arch. Pflüger's ges. Physiol. 1897, 65, 281 (112)
- LABAT J. Thèse Doct. Pharm. Paris 1961 (37-106-107-108-110
111)
- LAURELL C.B. The plasma Proteins (Dutmann F.W.) Vol. 1 Chap. 10
Academic Press. N.Y. et Londres (1960 (147)
- LINDENBAUM S. Bull. Inter. Ac. Polon. Sc. et Let. 1926, 1041 (1)
- MALANGEAU P. Communication personnelle (64)
- MASSON M. Thèse Doct. Pharm. Paris 1950 (62)
- MATSON S. et KOUBLER-ANDERSON E. Ann. Rep. Agr. Coll. Suède 1947, 14, 290 (11)
- MEHL J.W. - HUMPHREY J. et WINZLER R.J. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1949, 72 106 (160)
- MISSON G. Chem. Ztg. 1908, 32, 633 (75)
- MNICH E. Bull. Intern. Ac. Polon. Sc. et Let. 1926, B, 123 (2)
- MONTREUIL J. Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39 supp. III, 3 (118)
- MORNER C.T. Zentz. Physiol. 1893, 1, 581 (113)
- NEUBERG C. Biochem. Z. 1908, 9, 551 (26-80-93)

- NEUBERG C. et BRAHN B.
Biochem. Z. 1907, 5, 443 (81-94)
- OLCOTT H.S. et FRAENKEL-CONRAT H.
Chem. Rev. 1947, 41, 151 (18)
- OTOLSKI S.
J. Pharm. Chim. 1935, 21, 170 (85)
- PAVY F.W.
Proc. Roy. Soc. 1893 54, 53 (114)
- PEREZ C.
Thèse Pharm. Paris 1949 (72)
- PERLES R.
Thèse Pharm. Paris 1962 (51-61)
- PISCHINGER E.
Bull. Intern. Ac. Polon. Sc. et Let. 1931, B, 123 (3)
- POSTERNAK S.
C.R. Ac. Sc. 1919, 168 - 158 (40)
- POSTERNAK S.
C.R. Ac. Sc. 1919 - 168, 1216 (41)
- POSTERNAK S. et POSTERNAK Th.
Helv. Chim. Acta 1929, 12, 1165 (54-86)
- RIMINGTON C.
Biochem. J. 1940, 34, 931 (116)
- ROCHE J. et COURTOIS J.
Exposés Ann. Bioch Med. 1944, 4, 219 (52)
- SANFOURCHE A.
Bull. Soc. Chim. Fr. 1933, 53, 951 (82)
- SANFOURCHE A.
C.R. Ac. Sc. 1938, 206, 1820 (83)
- SCHMID K.
J. Amer. Chem. Soc. 1950, 72, 2816 (137).

- SCHMID K.
J. Amer. Chem. Soc 1953, 75, 60 (124)
- SCHMID K.
J. Amer. Chem. Soc. 1953, 75, 2552 (138-187)
- SCHMID K.
J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77, 742 (139)
- SCHMID K.
Biochim. Biophys. Acta 1961, 47, 440 (140)
- SCHULTZE H.E.
Protides of the Biological fluids. Onzième colloque de Bruges (1963, 288) - Elsevier Publishing Compaby . Amsterdam (1964) (131-146)
- SCHULTZE H.E. - BIEL H. - HAUPT H. et HEIDE K.
Naturwiss. 1962, 49, 16 (132)
- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Naturwiss. 1961, 48, 696 (145-198)
- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Naturwiss. 1961, 48, 719 (149-200)
- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Klin. Wochschr. 1962, 40, 427 (126-189)
- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Naturwiss. 1962, 49, 15 (142-194)
- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Clin. Chim. Acta 1962, 7 854 (156-159-172-174-176-202)
- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Naturwiss. 1962, 49, 133 (136-178-192-195)
- SCHULTZE H.E. - HEIDE K. et HAUPT H.
Nature 1963, 200, 1103 (181-191)

- SCHULTZE H.E. - GOLLNER I. - HEIDE K. - SCHONENBERGER M.
et SCHWICK G.
Z. Naturforsch. 1955, 10b, 463 (127-168-190)
- SCHULTZE H.E. - SCHONENBERGER M. - SCHWICK G.
Biochem. Z. 1956 328, 267 (120-183)
- SCHULTZE H.E. et SCHWICK G.
Clin. Chim. Acta 1959, 4, 15 (121-184)
- SMITH E.L. - BROWN D.M. - WEIMER H.E. - WINZLER R.J.
J. Biol. Chem. 1950, 185, 569 (123-186)
- STASTNY M. et HOREJSI J.
Clin. Chim. Acta. 1961, 6, 782 (173)
- TOFFOLO C. et MARELLI O.
Rendiconti. Istituto. Superiore di Sanita Rome.
1947, 10, 167 (66)
- VAUX SAINT CYR Ch. de.
Biologie Médicale 1963, 52, 571 (203)
- VAUX SAINT CYR Ch. de - COURCON J. et GRABAR P.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 579 (204)
- WEIMER H.E. - MEHL J.W. et WINZLER R.J.
J. Biol. Chem. 1950, 185, 569 (122-185)
- WIAZOWNICKA H.
Bull. Intern. Ac. Polon. Sc. et Let. 1933, 107 (4)
- WINTESTEIN E.
Ber. Deutsch. Chim. Ges. 1897, 30, 2299 (45)
- WINTESTEIN E.
Zeitschr. Physiol. Chim. 1908, 58, 118 (44)
- WINZLER R.J.
The Plasma Proteins (Putnam F.W.) Vol. I. 309
Academic Press. N.Y. et Londres 1960 (154-171)

- WINZLER R.J. et SMITH J.M.
J. Clin. Invest. 1948, 27, 617 (153-170)
- WORMSER G.
Thèse Doct. Pharm. Paris 1955 (25-43-63-97-103
109-89).
- YOUNG L.
Biochem. J. 1936, 30, 252 (67).

+

+

+

: - MATERIEL et PRODUITS CHIMIQUES -

- M. 1 - AGAROSE : Industrie Biologique Française (35 Quai du Moulin de Cage - GENNEVILLIERS - Seine).
- M. 2 - Amidon de pomme de terre : BENDER et HOBETIN, Labo-Moderne
DANNATT : 198, rue St Jacques. (6, rue Vrillère - Paris 1er)
- M. 3 - Carboxymethylcellulose : CM 50 - WHATMAN.
- M. 4 - Papier pour chromatographie WHATMAN N° 1
- M. 5 - Papier pour chromatographie WHATMAN N° 3.
- DIFCO : Opodex, 18, rue Rivel - La Garene - Colombes.
- M. 6 - ANTIGENE COMPLET DE FREUND (DIFCO)
- M. 7 - GELOSE PURIFIEE (DIFCO)
- M. 8 - Evaporateur rotatif : FRANCE EQUIPEMENT, 41 Avenue des Ternes - Paris 17ème.
- M. 9 - Gamma-globulines placentaires. INSTITUT MERIEUX - LYON
- M. 10 - Insuline CHOAY, 48 Av. Théophile Gautier - Paris 16ème
- LABO-MODERNE : 6 rue de la Vrillère - Paris 1er.
- M. 11 - ELPHOR "H" : électrophorèse sur papier et sur gel d'agar.
- M. 12- ELPHOR "Vap" : électrophorèse préparative en veine liquide.
- M. 13 - MERSEPTYL. Laboratoire QUERNEVILLE , 11 rue Edouard Jacques - Paris 14ème.
- M. 14 - MONTAGNE : collecteur de fractions : APELAB 35, rue des Ecoles - Bagneux - Seine.
- M. 15 - NYCOLINE 5 000 : Laboratoire NYCO, 159, rue de Rome (18ème)
- M. 16 - Verre de couleur VUV 4 ; PARRA-MANTOIS, 11 chemin de Ronde - Le Vésinet - S & O.

- M. 17 - Phytate de sodium : Laboratoire CIBA, 57 quai d'Orsay
Paris 7ème.
- M. 18 - POLYVINYLPIRROLIDONE : PROLABO, 12, rue Pelée - Paris 11ème.
- REGIEM SIMONETON et Cie 6 Allée du Bel-Air - Le Raincy - S & O
- M. 19 - LABOFILTRE (100 ml)
- M. 20 - SIMPLEX avec monte-jus (8 litres)
- M. 21 - VITEX (pour des volumes supérieurs à 30 l.)
- M. 22 - SERUMALBUMINE HUMAINE : lot N° 585, Centre National de
Transfusion sanguine, 6, rue Alexandre Cabanel - Paris 15ème
- M. 23 - Papier pour chromatographie : SCHLAFICHER et SCHULL N° 2043
CERLABO : 13, rue Dotencourt - Paris 17ème.
- M. 24 - SEPHADEX : Pharmacia - Uppsala - Suède, Jarre et Jacquin
6, rue Pierre Curie - Paris 5ème.
- M. 25 - PARAFILM - SERLABO, 26, rue St. Gilles - Paris 3ème.
- M. 26 - Boite pour coloration : SERLABO, 26, rue St-. Gilles
Paris 3ème.
- SOFRANIE : 40, rue D'Artois - Paris 8ème.
- M. 27 - Electrophorèse sur papier et sur gel d'agar : L.K.B.
N° 3 276 B.N
- M. 28 - Emporte pièce pour gel d'agar L.K.B. N° 6 807 A.
- M. 29 - UVICORD ENREGISTREUR L.K.B. N° 4 701 A
- M. 30 - Compensateur E.A. 388 - METHROM
- M. 31 - Electrode combinée E.A. 120 - METHROM
- M. 32 - Micro-électrode combinée E.A. 125 - METHROM.

Compagnie TECHNICON : Route Nationale N° 1 - DOMONT - S & O

M. 33 - Autoanalyseur

M. 34 - Collecteur de fractions-distributeur d'échantillons G.M

M. 35 - Continuous Digester.

M. 36 - Autograd.

M. 37 - Minipump.

M. 38 - Titromatique "QUERE" : JOUAN, 113, bd. St. Germain
(Paris 6ème).

M. 39 - SERPASTEUR 36, rue du Docteur Roux - Paris 15ème.

- M. 40 - Microsublimateur type MS 32-4 ; USIFROID, 7, rue
Moreau-Vauthier - Boulogne (Seine)

M. 41 - VISCORA S.A. : NOJAX 20 - 40 - 60 et 80 - SOPHIX
41, rue du Dr. Dumont - Levallois - Seine-

M. 42 - ZYMOSAN : Nutritional Biochemical Corporation.



- TABLE DES MATIERES -

P A R T I E T E C H N I Q U E.

I. CONDITIONS OPERATOIRES POUR LA PRECIPITATION PHYTIQUE.

A. Principe	2
B. Précipitation analytique	3
C. Précipitation à l'échelle préparative		5

II. CONDITIONS OPERATOIRES POUR LES DIFFERENTS DOSAGES PERMETTANT LE CALCUL DE L'INDICE DE COMBINAISON PHYTIQUE.

A. Principes fondamentaux de l'analyse automatique	10
B. Principe de la mesure de l'indice de combinaison phytique	21
C. Minéralisation.	21
D. Dosage du phosphore orthophosphorique dans le minéralisat	22
E. Dosage de l'azote ammoniacal dans le minéralisat	27
F. Minéralisation automatique continue avec dosage simultané de l'azote et du phosphore	34

III. DISPOSITIF AUTOMATIQUE POUR L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE DIVERS PARAMETRES SUR LA PRECIPITATION PHYTIQUE.

A. Principe	43
B. Technique	44
C. Enregistrement des paramètres variables		48

IV - CHROMATOGRAPHIE DES PROTEINES.

A. Chromatographie sur gel de dextrane.....	56
B. Chromatographie sur carboxymethyl- cellulose	59
C. Etude des fractions chromatographiques.	59

V. - ELECTROPHORESE DE ZONE :

A. Electrophorèse sur papier pH 8,6	60
B. Electrophorèse sur papier pH 3,9	61
C. Electrophorèse sur gel d'amidon	61
D. Electrophorèse sur gel d'agar	64
pH 8,2	
E. Coloration des électrophorèses.	
1- Révélation des protéinogrammes par le noir amido 12 BN	66
2- Révélation des protéinogrammes par le vert de Lissamine	67
3- Coloration des glycoprotéinogrammes par l'acide périodique, réactif de SCHIFF.	68

VI. - ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN VEINE LIQUIDE.

A. Separation électrophorétique	70
B. Dosage des protéines par la méthode de LOWRY	72
C. Dosage des oses réducteurs libérés par hydrolyse	75
D. Dosage du tryptophanne combiné	76

VII. - <u>IMMUNOCHIMIE DES PROTEINES.</u>	
A. Immunoélectrophorèse 79
B. Immunodiffusion (Technique d'OUCHTERLONY)	81
C. Diffusion contrôlatérale 83
D. Epuisement d'un immunosérum par un mélange de protéines 83
E. Immunisation d'un lapin contre un mélange de protéines 84
VIII. - <u>FRACTIONNEMENT DES MELANGES DE PROTEINES PAR RELAR- GAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.</u> 86
IX. <u>PREPARATION DE L'EXTRAIT PERCHLORIQUE.</u> 90
X. - <u>FRACTIONNEMENT DES PROTEINES PAR LE RIVANOL.....</u>	91
<u>BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE TECHNIQUE</u> 93

- P A R T I E E X P E R I M E N T A L E -

- INTRODUCTION : Historique	101
-----------------------------	-------	-----

PREMIER CHAPITRE

- <u>Etude physico-chimique de l'acide phytique et de ses sels</u> :		
A. Etat Naturel et modes d'obtention	105
B. Propriétés physico-chimiques du phytate de sodium et de l'acide phytique		106
C. Hydrolyse par la phytase	107
D. Autres sels de l'acide phytique	109
E. Courbes de titration	111
F. Formule de l'acide phytique	114

DEUXIEME CHAPITRE :

- <u>Combinaison de l'acide phytique avec les protéines</u>		116
---	--	-----

TROISIEME CHAPITRE :

- <u>Etude de l'influence de divers paramètres sur la précipitation phytique des protéines</u>	118
I. Introduction	118
II. Influence de l'acide citrique	119
III. Influence du pH	121
IV. Influence de la concentration en acide phytique	126
V. Influence de la force ionique en cations monovalents	131
VI. Influence du temps de contact	142

VII. Influence de la température	142
VIII. Récapitulation du rôle de l'acide citrique utilisé comme tampon lors d'une précipitation phytique dans un but analytique	142
Conclusions générales du troisième chapitre	143

QUATRIEME CHAPITRE :

- <u>Précipitation phytique de fractions des protéines plas-</u> <u>matiques obtenues en électrophorèse préparative.....</u>	146
---	-----

CINQUIEME CHAPITRE :

- <u>Etude des propriétés physico-chimiques du surnageant</u> <u>et de l'extrait phytique.</u>	151
---	-----

SIXIEME CHAPITRE :

- <u>Classification des glycoprotéines du sérum</u>	153
I. Définition des glycoprotéines du sérum ..	155
II. Critères physico-chimiques d'identification	157

SEPTIEME CHAPITRE :

- <u>Etude électrophorétique de la composition de l'extrait phy-</u> <u>tique d'un sérum sanguin.</u>	
I. Composition d'un extrait phytique à pH 2,10	167
II. Influence de divers paramètres sur la composition d'un extrait phytique	168

A- Influence du pH du milieu	170
B- Influence de la concentration en chlorure de sodium	173
C- Influence d'un léger défaut en acide phytique....		177

HUITIEME CHAPITRE :

- <u>Etude immunochimique de l'extrait phytique</u>	180
---	-------	-----

NEUVIEME CHAPITRE :

- <u>Identification des glycoprotéines de l'extrait phytique par réactions spécifiques</u>	185
--	-------	-----

DIXIEME CHAPITRE :

- <u>Application de diverses techniques de fractionnement à la caractérisation des glycoprotéines phytosolubles</u>		186
I. Caractérisation des glycoprotéines perchlorosolubles de l'extrait phytique....		188
II. Fractionnement d'un extrait phytique par le Rivanol	191
III. Fractionnement d'un extrait phytique par électrophorèse préparative en veine liquide	192
IV. Fractionnement d'un extrait phytique par filtration sur gel de dextrane	197
V. Fractionnement des constituants de l'extrait phytique par relargage au sulfate d'ammonium	198
- Conclusion	215

ONZIEME CHAPITRE :

- Bilan général de l'identification des constituants de l'extrait phytique. 217

DOUZIEME CHAPITRE :

- Apport de l'acide phytique comme réactif dans l'étude des glycoprotéines. 221

CONCLUSIONS GENERALES : 223

- Bibliographie de la partie expérimentale. 225
- Matériel et Produits chimiques. 236
- Table des Matières. 238

卍

卍

卍+

