

N° d'ordre 139

50 376

1966

39

50.376

1366

39

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

YVES MOSCHETTO

Première Thèse

Les kératines de la laine.

Etude physico-chimique

et fractionnement

Soutenue le 5 Février 1966, devant la Commission d'Examen

JURY : MM. les Professeurs J. GERMAIN, Président

J. MONTREUIL

G. BISERTE



1966



030 048547 0

ERRATA

- Page 36 : Tableau V, 2ème colonne : au lieu de 2 X G75, lire 1 X G75.
- Page 64 : Tableau XV, 2ème colonne : au lieu de Phénylalanine : 3,8, lire Phénylalanine : 1,8
- Page 66 : Tableau XVI, 4ème colonne : au lieu de Cystine : 12,3, lire Cystine : 12,3.
- Page 90 : 11ème ligne au lieu de bande, lire bandes
- Page 111 : Tableau XXV, 1ère colonne : au lieu de Arginine : 7,0, lire Arginine : 8,0
- Page 127 : I - A - 1) ligne 5 : au lieu de fournie, lire fournies
- Page 131 : Tableau XXVII, 5ème colonne : au lieu de cellule n° 6, pH = 4,30, lire pH 4,42.

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 : M. 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
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 BALZAC, 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 Biologique
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
SCHILTZ, 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 Electricité 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

AVANT-PROPOS

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur GERMAIN, Président de Jury et à Messieurs les Professeurs MONTREUIL et BISERTE de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Nous nous permettons de leur exprimer ici notre respectueuse estime et notre vive gratitude.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur le Professeur BOULANGER de m'avoir accueilli dans son Laboratoire. J'ai pu y apprendre à travailler dans des conditions presque idéales. Je lui suis particulièrement reconnaissant d'avoir mis à ma disposition une équipe de collaborateurs qui m'a permis d'assurer correctement le travail du laboratoire en même temps que celui propre à mes recherches.

Pendant la réalisation, puis la rédaction de cette thèse, Monsieur le Professeur BISERTE n'a jamais ménagé son temps et ses conseils. Permettez que je vous assure ici de toute ma reconnaissance ainsi que de ma plus respectueuse et fidèle amitié.

Quant à mon ami le Professeur DAUTREVAUX, vous avez été pour moi l'élément de détente dans le travail. Nous avons souvent oeuvré ensemble, chacun suivant ses responsabilités à des sujets divers, mais j'aime souvent vous retrouver

sans but précis et vous savez pourquoi. Soyez remercié pour cette amitié réciproque et que notre collaboration dure le plus longtemps possible.

Le sujet de cette thèse n'entraîne pas directement dans le cadre des recherches de mon ami le Professeur HAVEZ, nous travaillons malgré tout à la même oeuvre. Les années à venir nous rapprocheront sans doute davantage.

Je n'oublierai pas non plus Monsieur PIGACHE à qui je dois d'avoir été introduit dans ce magnifique Laboratoire.

Que mes collaborateurs Mademoiselle BOUTTEAU, Messieurs VANDEPERRE et DESMARES sachent combien j'ai apprécié leur dévouement et leur travail efficace.

Je remercie tous mes collègues et tout le personnel du laboratoire, en particulier ceux qui, moralement ou matériellement, de près ou de loin ont participé à ce travail de recherche.

Nous tenons à remercier tout spécialement le United States Department of Agriculture dont le Contrat n° FG-Fr-100-60, P.L. 480 projet UR-E9-(20)1 a fourni les crédits nécessaires à la réalisation de ce travail.

AVERTISSEMENT AU LECTEUR

Le travail que nous présentons est exposé en 7 chapitres.

Le premier chapitre rappelle quelques connaissances fondamentales relatives à la structure de la laine.

Les chapitres II à V constituent l'exposé de notre travail personnel.

Le chapitre VI est plus particulièrement réservé à la discussion générale des résultats acquis et aux conclusions. Ce chapitre est précédé dans la thèse d'une feuille bleue, épaisse et non paginée qui permet facilement l'ouverture du volume à cet endroit.

Le chapitre VII est consacré à l'exposé des techniques. À chaque technique est attribué un numéro précédé de la lettre T (T 21) par exemple. Ces références sont rappelées d'une part dans le texte pour indiquer les techniques utilisées, et d'autre part dans la table des matières.

La bibliographie est imprimée sur papier jaune. En tête figurent les noms d'auteurs classés par ordre alphabétique, suivis du nom de la revue dans laquelle est publié le travail cité. Viennent ensuite les références : année, tome, première page de l'article. Les numéros entre parenthèses qui suivent les références correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.

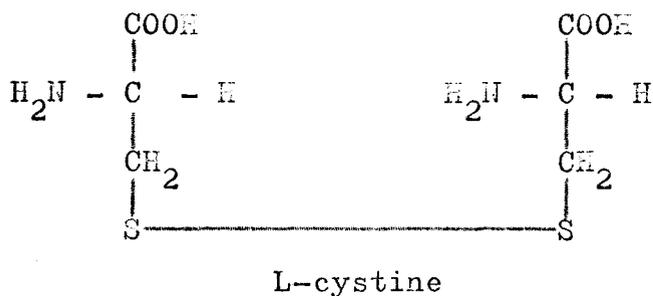
La table des matières située à la fin de l'ouvrage est imprimée sur papier rose-saumon.

ABREVIATIONS UTILISEES

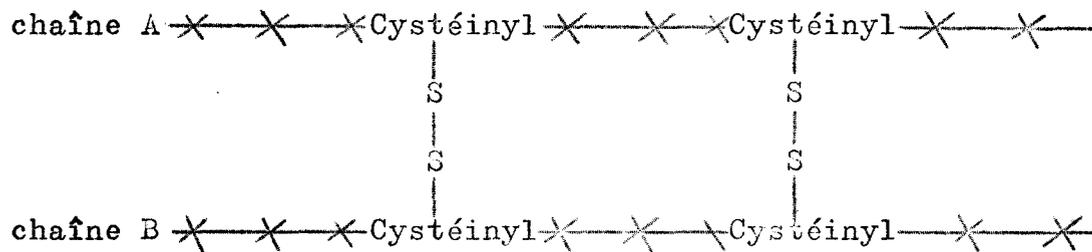
- SCMK : S-carboxyméthylkératines (voir page 163)
- SCMK-A : Fraction majeure, pauvre en soufre et précipitable en milieu acide.
- SCMK-B : Fraction majeure, riche en soufre et acido-soluble.
- SCMK-RG : Fraction mineure riche en glycocolle et en tyrosine.
- SCMK-M : Fraction mineure riche en sérine.
- SCMK(PS- α 1) : Préparation particulière obtenue par fractionnement acétonique des SCMK-A.
- SCMK(OC)
SCMK(PC)
SCMK(LV) : Les indications OC, PC et LV entre parenthèses précisent, quand il y a lieu, l'origine des SCMK : orthocortex, paracortex ou laine vierge.
- Les abréviations SCMK-A(OC), SCMK-B(OC), etc. précisent l'origine des SCMK-A ou SCMK-B, etc.

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

Les kératines forment une classe de protéines résistantes et insolubles que l'on trouve dans l'épiderme des Vertébrés et dans leurs appendices : poils, plumes, griffes, cornes etc. Le nom de "kératinisation" est donné au processus par lequel ces tissus deviennent durs et insolubles. Un certain nombre de caractères physiques et chimiques sont communs à l'ensemble des kératines, en particulier leur richesse en L-cystine



Cet amino-acide est en grande partie responsable de la dureté et de l'insolubilité des kératines. Il peut participer à la formation d'un réseau tridimensionnel dense de chaînes peptidiques, par l'intermédiaire de ponts disulfure interchaînes (ou interpeptidiques) créés entre deux résidus de cystéine appartenant à deux chaînes peptidiques voisines.



Parmi les différentes kératines nous avons choisi d'étudier particulièrement le poil de mouton Mérinos ou laine

Mérinos. Ce choix a été guidé par les études antérieures effectuées dans le laboratoire sur ce sujet.

Deux méthodes classiques permettent de solubiliser partiellement la fibre de laine. Il s'agit soit de la réduction des ponts disulfure (GODDARD et MICHAELIS) (1), soit de leur oxydation ((SMITH et HARRIS) (2), TOENNIES et al. (3), ALEXANDER et al. (4)).

Les dérivés kératiniques sont isolés soit sous la forme de S-carboxyméthylkératines (ou SCMK par abréviation), la réduction étant suivie d'une alkylation par l'acide mono-iodo-acétique, soit sous forme de kératoses, l'oxydation étant réalisée par les peracides. Le fractionnement des mélanges protéiques complexes qui sont ainsi obtenus a fait l'objet de nos recherches.

Nous avons choisi comme mode d'extraction la voie de la réduction par le thioglycolate de potassium en milieu alcalin suivant la méthode de GILLESPIE (5) et GILLESPIE et al. (6).

La réduction et l'extraction sont suivies d'une S-carboxyméthylation pour éviter le repontage ultérieur des groupes thiol apparus. Nous n'avons pas retenu l'extraction des kératoses par oxydation de la laine à l'aide des peracides (ALEXANDER et al.) (7) ; car nous avons en effet constaté, à la suite de O'DONNELL et THOMPSON (8), la formation de peptides dialysables en assez grande quantité. Ces méthodes d'oxydation entraînent donc la coupure d'un certain nombre de liaisons peptidiques.

Les premiers essais de fractionnement des kératines ont été faits en 1935 sur les S-carboxyméthylkératines par GODDARD et MICHAELIS (9). Par précipitation au sulfate d'ammonium ces auteurs ont pu isoler deux fractions différant notablement par leur teneur en soufre.

Depuis, de nombreux travaux ont été effectués en vue de l'isolement de types de kératines bien définis.

Les fractions caractérisées sont isolées, soit par

oxydation (ALEXANDER et EARLAND (10) ; SPEAKMAN et DAS (11) ; CORFIELD et al. (12) ; O'DONNELL et THOMPSON (13), soit par réduction GILLESPIE et LENNOX (14) ; GILLESPIE et al. (15), soit encore par hydrolyse partielle LINDLEY (16), BISERTE et PIGACHE (17) ; PIGACHE (18) ; BLACKBURN (19)).

Tous ces travaux conduisent à l'isolement de deux classes de protéines bien distinctes, l'une étant pauvre en soufre et l'autre riche en soufre comparativement à la laine d'origine. Ils utilisent des méthodes physiques de séparation : précipitation au point iso-électrique, précipitation fractionnée par des ions métalliques ou encore extraction fractionnée. Ces méthodes valables pour obtenir un fractionnement de base n'aboutissent malgré tout qu'à l'obtention de mélanges protéiques très complexes. Lorsque nous avons commencé notre travail en 1960, en vue de résoudre le problème du fractionnement des kératines, nous nous sommes proposés :

1^o) d'isoler un certain nombre de composants morphologiques de la laine.

(Les raisons de cette étape préliminaire sont exposées au chapitre II de cette thèse) ;

2^o) d'appliquer les méthodes chromatographiques les plus récentes et de tenter d'isoler un certain nombre de protéines ou de groupes de protéines bien définis.

C H A P I T R E I

GENERALITES SUR LA STRUCTURE DES KERATINES DE LA LAINE

I - INTRODUCTION

Dans ce chapitre nous nous limiterons volontairement à un bref aperçu sur la constitution des kératines de la laine en vue de permettre une bonne compréhension des chapitres suivants.

D'ailleurs deux revues générales sur les kératines ont été publiées pendant la réalisation de notre travail.

La première résume les connaissances acquises sur les kératines jusqu'en 1962 (LUNDGREN et WARD) (20), la seconde plus importante résume l'ensemble des connaissances sur les kératines et analyse les travaux effectués jusqu'à la fin de 1964 (GREWHER et al.) (21)

II - MORPHOLOGIE DE LA LAINE

La laine, ainsi que tous les poils animaux, a une constitution morphologique complexe.

De l'extérieur vers le centre de la fibre on distingue plusieurs zones nettement différenciées.

La CUTICULE (Figure 1) correspond à la zone externe que l'on peut subdiviser en trois régions :

EXCUTICULE

MESOCUTICULE

ENDOCUTICULE

Cette membrane externe entoure une zone interne appelée CORTEX (Figure 2). Le cortex est lui même constitué de cellules corticales qui possèdent elles aussi une structure définie (microfibrilles, protofibrilles et ciments). Les cellules corticales sont liées entre elles par un ciment intercellulaire.

Le cortex peut être divisé en deux zones distinctes

L'ORTHOCORTEX facilement accessible aux colorants et aux réactifs chimiques.

Le PARACORTEX peu accessible aux colorants et aux réactifs chimiques.



FIGURE 1

Empreinte négative sur polystyrène d'une fibre de laine de 21 microns de diamètre.
Ombrage au chrome et microscopie électronique d'après SWERDLOW et SEEMAN (22).

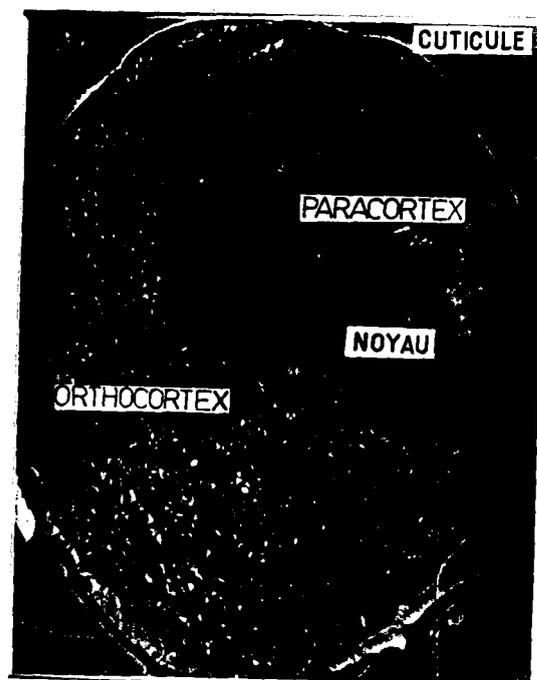


FIGURE 2

Section transversale d'une fibre de laine Mérinos d'Australie vue au microscope électronique. La différence dans la texture des macrofibrilles est très marquée : fines granulations dans l'orthocortex et granulations grossières dans le paracortex. D'après ROGERS (23).

L'hétérogénéité du cortex de la fibre a été mise en évidence pour la première fois en 1953 par HORIO et KONDO (24) en fonction des résultats obtenus par la fixation sélective de certains colorants.

La structure ultrafine des cellules corticales ne peut être révélée que par la microscopie électronique à très fort grossissement. L'orthocortex et le paracortex (Figures 3 et 4) sont alors très nettement différenciés par l'arrangement spatial des microfibrilles.

En général, en microscopie électronique après fixation de métaux lourds, on distingue deux types de motifs :

- 1) ceux absorbant peu les électrons, tels que les "microfibrilles".
- 2) ceux absorbant fortement les électrons et qui constituent la "matrice" dans laquelle sont emballées les microfibrilles.

Les spécialistes de la microscopie électronique considérant que la fixation des métaux lourds est en relation directe avec la teneur en cystine des molécules. Les microphotographies obtenues permettent donc de conclure que les microfibrilles sont pauvres en soufre, et que la matrice est riche en soufre.

Ces données sont d'ailleurs confirmées par les études chimiques.

Les protéines extraites de la laine soit par réduction soit par oxydation sont fractionnables par précipitation en milieu acide. Le précipité SCMK-A ou α -kératose a une teneur en soufre plus faible que les protéines d'origine alors que le surnageant SCMK-B ou γ -kératose a une teneur en soufre beaucoup plus élevée.

L'isolement de ces deux fractions "pauvre en soufre" et "riche en soufre" est en relation directe avec la structure morphologique de la fibre, d'après les travaux des chercheurs australiens.

La fraction pauvre en soufre est issue des "micro-



FIGURE 3

STRUCTURE FINE DE L'ORTHOCORTEX
(d'après ROGERS) (25)

Arrangement spiralé des microfibrilles dans l'orthocortex (poil de lapin). Cette microphotographie électronique montre les macrofibrilles spiralées (mac) partiellement séparées par un matériau absorbant fortement les électrons (im) comme dans un segment orthocortical de laine mais avec une plus forte proportion de "matrice".

Les flèches indiquent des microfibrilles particulièrement bien délimitées, sectionnées transversalement alors que les autres le sont plus ou moins obliquement.



FIGURE 4

STRUCTURE FINE DU PARACORTEX (d'après ROGERS) (26)

Arrangement des microfibrilles dans le paracortex de la laine mérinos.

Les microfibrilles ont environ 60 \AA de diamètre et sont séparées par une fine couche de "matrice". Cette section transversale montre des empilements hexagonaux (H), en couches (L) et irréguliers (I).

Les macrofibrilles individuelles sont partiellement séparées par un matériau absorbant fortement les électrons (im 1) en masses importantes et en "failles" (im 2 et im 3).

fibrilles" alors que la fraction riche en soufre provient de la "matrice". Cette interprétation est principalement confirmée par le fait que les protéines pauvres en soufre sont fibreuses et fournissent aux rayons X, sous forme de film orienté ou de fibre refilee, un diagramme de diffraction typique des α -kératines tandis que les protéines riches en soufre donnent seulement un halo diffus correspondant à une structure amorphe. ROGERS (27) a pu démontrer que les protéines riches en soufre extraites d'une laine oxydée et traitée en milieu neutre provenaient au moins en partie de la matrice. D'autre part, un nombre important de preuves indirectes ont été apportées à cette conception par MERCER (28), par ROGERS (29) et par FILSHIE et ROGERS (30).

Cependant, pour les chercheurs anglais l'isolement de ces deux fractions ne serait qu'un "artefact", sans aucun rapport avec la structure morphologique, qui serait conditionné par la coupure des chaînes protéiques isolées (BLACKBURN) (31). Les caractères de solubilité de ces deux fractions seraient en relation directe avec leur composition en aminoacide (CORFIELD) (32).

Mise à part cette divergence sur l'interprétation de faits expérimentaux bien établis les connaissances actuelles sur la structure de la laine sont assez bien résumées par les schémas de la figure 5 reproduits d'après l'article de FRASER et LENNOX (33).

FIGURE 5

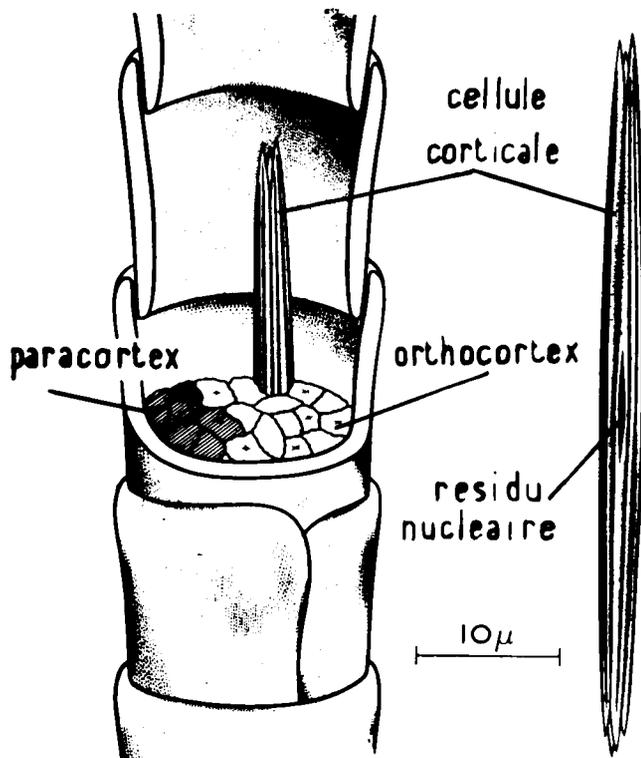
ELEMENTS STRUCTURAUX DE LA FIBRE DE LAINE

La figure 5 A donne une vue générale des éléments morphologiques de la fibre de laine telle qu'on peut l'examiner au microscope optique ou en microscopie électronique à faible grossissement (10 000 X).

La figure 5 B schématise les éléments que l'on peut observer en microscopie électronique à très fort grossissement, c'est-à-dire les microfibrilles et la matrice agglomérées en microfibrilles.

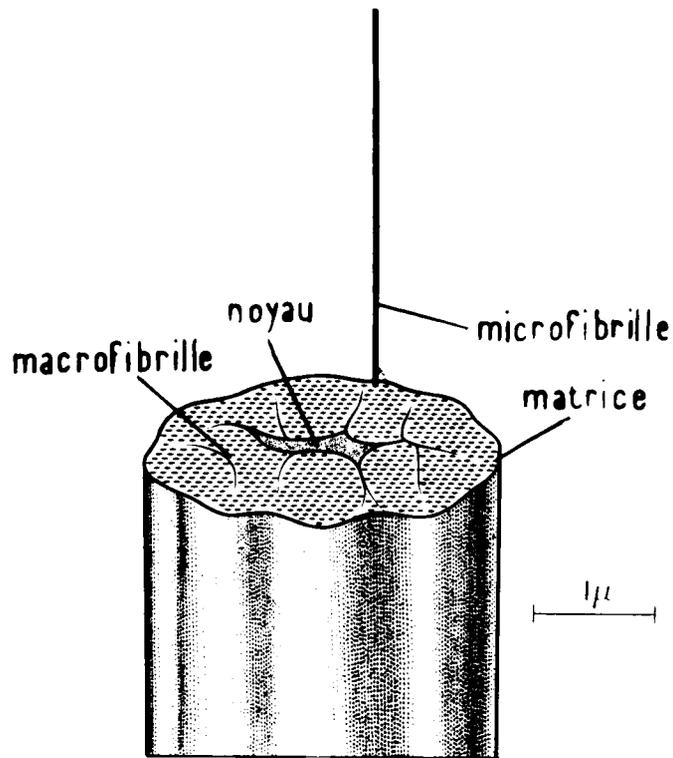
La figure 5 C est déduite d'observations à de très forts grossissements et donne une idée de la substructure d'une microfibrille. Celle-ci est composée de 11 protofibrilles constituées elles-mêmes de chaînes protéiques d'amino-acides disposées en hélice α (Figure 5 D).

Les dimensions de ces unités structurales sont en accord avec les distances trouvées par les mesures de diffraction des rayons X.



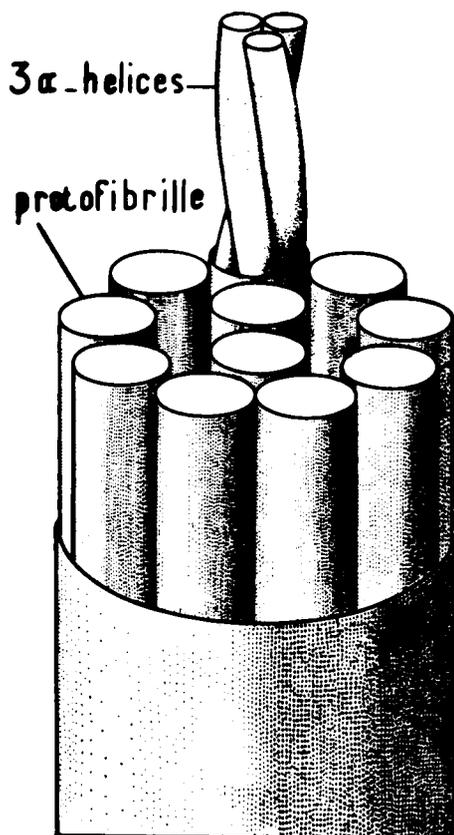
FIBRE DE LAINE

- A -



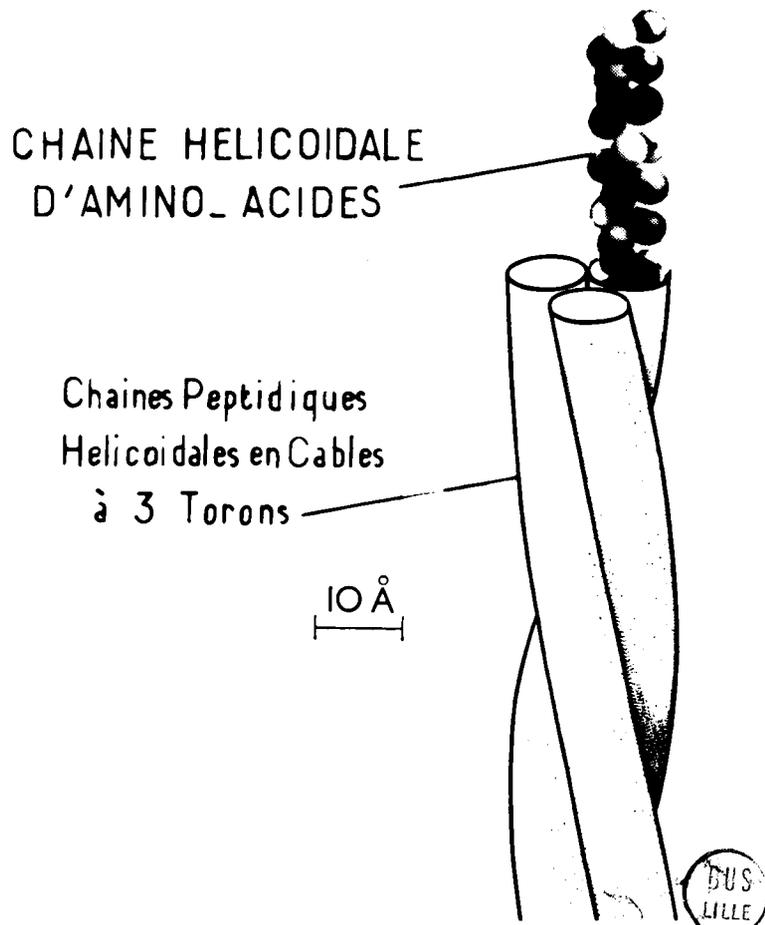
CELLULE CORTICALE

- B -



MICROFIBRILLE

- C -



PROTOFIBRILLE

- D -

BUS LILLE

C H A P I T R E I I

SEPARATION DES CONSTITUANTS MORPHOLOGIQUES DE LA LAINE. ACTION DE LA PEPSINE EN RELATION AVEC LA STRUCTURE MORPHOLOGIQUE DES FIBRES KERATINIQUES

I - INTRODUCTION

L'étude des kératines de la fibre de la laine se heurte à de nombreuses difficultés, la principale étant l'insolubilité de la laine dans les solvants usuels des protéines. D'autre part, la complexité morphologique de la laine constitue elle-même un autre obstacle, car les protéines constitutives de chaque composant morphologique peuvent être différentes. Pour cette raison, il nous a paru nécessaire, avant d'entreprendre une étude structurale des kératines, de procéder en premier lieu à une séparation des constituants morphologiques pour en extraire ensuite un certain nombre de protéines constitutives. Seule, la comparaison ultérieure des protéines ainsi extraites avec celles de la laine vierge pouvait nous démontrer si ce stade préliminaire entraînait une diminution de la complexité des protéines isolées.

Il est donc indispensable de faire appel à des méthodes de séparation des constituants morphologiques aussi douces que possible et n'altérant pas (ou très peu) les constituants protéiques.

La mise au point d'une telle méthode s'est vite avérée nécessaire. En effet, les techniques décrites sont en général trop brutales. Elles nécessitent un prétraitement qui altère la structure des protéines, ou mettent en jeu la destruction préférentielle de l'un des constituants.

C'est ainsi que MERCER (34) détruit préférentiellement l'orthocortex. La laine finement coupée est portée 1 h 30 à 120°C dans de l'eau en tube scellé. Ce traitement provoque le

phénomène de "supercontraction" de l'orthocortex qui peut être hydrolysé ultérieurement par la trypsine tandis que le paracortex et les cellules cuticulaires subsistent. GOLDEN et al. (35) utilisent également ce procédé avec des conditions expérimentales légèrement différentes.

Toutes les autres méthodes font intervenir un traitement acide plus ou moins violent. LINDLEY (36) hydrolyse les fonctions amides de la laine par traitement à l'acide cétyl-sulfonique. La laine ainsi traitée est partiellement dispersée par agitation dans les alcalis dilués (pH 11). L'orthocortex est dissout par les alcalis et il ne reste en suspension que des cellules riches en cystine et en proline ainsi que des débris cuticulaires.

Les autres auteurs (LUNDGREN (37) ; WARD et BARTULOVICH (38) ; SIMMONDS et BARTULOVICH (39) ; LEVEAU (40) ; SCHORBERL (41)) utilisent tous un prétraitement à l'acide chlorhydrique. La laine hydrolysée partiellement est ensuite désagrégée en constituants morphologiques à l'aide d'un broyeur à couteau.

Les conditions expérimentales et les caractéristiques de ces méthodes sont résumées dans le tableau I.

Le remplacement de l'hydrolyse acide par l'hydrolyse pepsique de la laine nous a permis de décrire une méthode satisfaisante d'isolement de l'orthocortex et du paracortex (T 28 à T 33)*

Cette méthode a été appliquée comparativement à deux fibres de structures morphologiques différentes : la laine Mérinos (constituée d'ortho et de paracortex) et la fibre Mohair

(*) Les nombres cités entre parenthèses et précédés de la lettre T correspondent aux paragraphes de la description des Techniques (Chapitre VII).

TABEAU I

METHODES DE PREPARATION DES CONSTITUANTS MORPHOLOGIQUES DE LA LAINE

AUTEURS	PRETRAITEMENT DE LA LAINE	POIDS DE FIBRE DISSOUT PAR LE PRETRAITEMENT (en g pour 100 g)	MOYEN DE SEPARATION DES CONSTITUANTS MORPHOLOGIQUES
LINDLEY (43)	Acide cétylsulfonique 0,05 M à 65° pendant 6 jours et demi	43,8	Dissolution de l'orthocortex à pH 11
SIMMONDS ET BARTULOVICH (44)	HCl 6 N à 30°C pendant 50 h.	43,8	Broyage mécanique et gradient de densité dans une solution aqueuse d'hydrate de chloral
LEVEAU (45)	HCl 6 N à 40°C pendant 6 h. ou HCl 6 N à 60°C pendant 15 minutes	6,4	Broyage mécanique
MERCER (46)	Superconcentration dans l'eau à 120°C pendant 90 minutes	13,5	Dissolution de l'ortho- cortex par la trypsine à pH 8,2 pendant 24 h. à 40°C
MOSCHETTO et al. (47)	Hydrolyse pepsique 7 à 10 jours	13,5	Dispersion manuelle dans l'eau



(presque exclusivement composée de kératines à caractère orthocortical). Nous démontrons au Chapitre III que les fractions morphologiques ainsi isolées ne sont pas modifiées chimiquement.

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE DU CORTEX ET METHODE PREPARATIVE D'ISOLEMENT DES CELLULES CORTICALES.

L'hydrolyse pepsique en milieu chlorhydrique non tamponné (T 28) suivant la technique de BISERTE et PIGACHE (42) nécessite l'utilisation d'un broyage mécanique (T 29) pour l'isolement des cellules corticales.

L'étude de leur teneur en soufre permet de distinguer deux types de cellules (Tableau II) : le premier est pauvre en soufre et s'apparente à l'orthocortex, le second, plus riche, peut être assimilé au paracortex. Toutefois, ce procédé par broyage se prête assez mal à des préparations en grande quantité de cellules corticales. En effet, les fibres de laine ne sont pas attaquées d'une façon homogène et la désagrégation est fonction de la présence plus ou moins prolongée d'une fibre donnée dans la région des couteaux du broyeur. A chaque période de broyage, on élimine alors des cellules provenant de régions du cortex assez différentes suivant le degré d'attaque respectif de chaque fibre.

La suppression du broyage pour l'obtention de cellules corticales à basse teneur en soufre (orthocortex) est rendue possible en élevant légèrement le pH initial du milieu d'hydrolyse pepsique (T 30). Dans ces conditions les cellules sont libérées naturellement (T 31) d'une façon très homogène ainsi que le révèlent leurs propriétés chimiques (courbes de la figure 9) ou l'examen microscopique. De plus, le rendement en orthocortex purifié est considérablement augmenté. Le broyage mécanique n'est alors utilisé que pour l'obtention du résidu fibreux (paracortex) afin d'éliminer les cellules orthocorticales résiduelles (T 33), ou pour l'élimination des cellules cuticulaires de l'orthocortex (T 32).

TABLEAU II
 VARIATION DE LA TENEUR EN SOUFRE (THIOL + DISULFURE) DU RESIDU FIBREUX
 (paracortex) ET DES CELLULES CORTICALES (Orthocortex) EN FONCTION DU TAUX DE
 DESAGREGATION DE LA FIBRE

I	2	7	8	9	10	11	16	21
Durée totale du traitement de désagrégation subi par la fibre en minutes								
II	14,87	57,83	70,84	75,19	78,92	81,23	88,25	100
Taux de désagrégation (pourcentage pondéral)								
III	3,52	3,67	3,82	3,91	4,00	4,06	4,13	4,18
Teneur en soufre de la laine non encore désagrégée								
IV	2,71 (*)	3,17	3,23	3,18	3,25	3,4	3,92	3,95
Teneur en soufre des cellules orthocorticales								

(*) La teneur en soufre de la laine vierge de départ était de 3,13 p. 100 ; celle de la laine après hydrolyse pepsique de 3,42 p. 100. Les parties du tableau encadrées en gros traits représentent les fractions à caractère nettement paracortical (ligne III) et à caractère nettement orthocortical (ligne IV).



B - INFLUENCE DU MILIEU D'HYDROLYSE PEPSIQUE SUR LA LIBERATION DES CELLULES CORTICALES

Dans une première série d'essais, le pH du milieu d'hydrolyse pepsique est ajusté uniquement au départ à 1,75 - 1,80. A la fin de l'hydrolyse sa valeur est de 2,38 - 2,40. Les pourcentages respectifs des fractions isolées sont réunis dans le tableau III (colonne 2).

Dans une seconde série d'essais, le pH est ajusté quotidiennement. La laine hydrolysée, malaxée à la main dans l'eau, dégage une importante quantité de cellules qui peut atteindre 60 p. 100 du poids de la fibre (colonne 3 du tableau III).

Après purification, les cellules constituant la fraction "pauvre en soufre" ont une teneur en soufre (thiol + disulfure) de 3,13 % ($\pm 0,10$). Les valeurs les plus probables se situent certainement entre 3,00 et 3,10 p. 100.

La fraction fibreuse a une teneur en soufre (thiol + disulfure) de 4,44 ($\pm 0,05$) p. 100.

C - CINETIQUE DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE (T 34)

La cinétique d'hydrolyse pepsique de la laine Mérinos (Figure 6) montre que le taux maximum d'hydrolyse est limité aux environs de 13-14 p. 100. Pour d'autres fibres, comme la fibre Mohair, le taux d'hydrolyse est plus bas et de l'ordre de 8 p. 100. Les résultats obtenus soit par dosage pondéral, soit par dosage de l'azote protéique sont concordants.

D - CINETIQUE DE LIBERATION DES CELLULES CORTICALES (T 35, T 36)

La libération des cellules corticales "Mérinos" est plus lente et moins complète que celle des cellules "Mohair" (Figure 7). Pour la laine Mérinos le taux maximum est situé suivant les essais entre 60 et 70 p. 100 au bout de quinze à vingt jours alors que pour la fibre Mohair la désintégration des cellules est totale

TABEAU III

INFLUENCE DU MILIEU D'HYDROLYSE PEPSIQUE SUR LA LIBERATION DES CELLULES CORTICALES

	MILIEU D'HYDROLYSE PEPSIQUE		
	1	2	3
	ECl N/10 pH initial 1,2 - 1,3	ECl N/10 Acétate de sodium pH initial 1,8	ECl N/10 Acétate de sodium pH constant 1,8
Poids de protéines solubilisées par la pepsine (*)	11-12	13	13-14
Poids de cellules corticales éliminées par désagrégation manuelle (**)	1	25	60
Rendement en orthocortex (**)	25	23	50
Rendement en paracortex (**)	5-10	8	6-7
Teneur en soufre de l'ortho- cortex (***)	3,20	3,15	3,13
Teneur en soufre du paracortex (***)	4,15	4,10	4,44

(*) En grammes pour cent grammes de laine vierge

(**) En grammes pour cent grammes de laine hydrolysée

(***) En grammes de soufre (thiol + disulfure) pour cent grammes de substance analysée



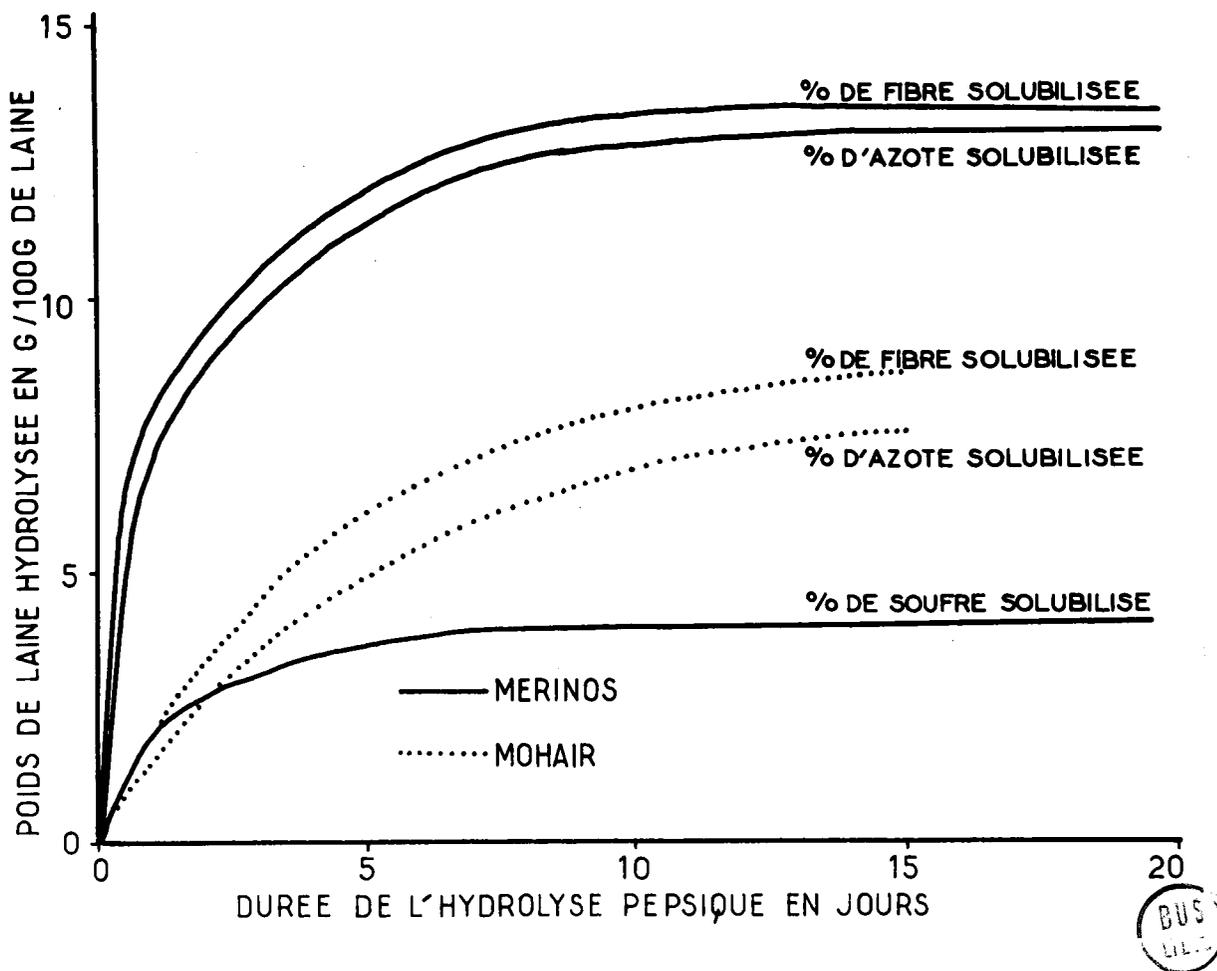


FIGURE 6

Cinétique de solubilisation de la laine par hydrolyse pepsique en milieu tamponné à pH 1,8.

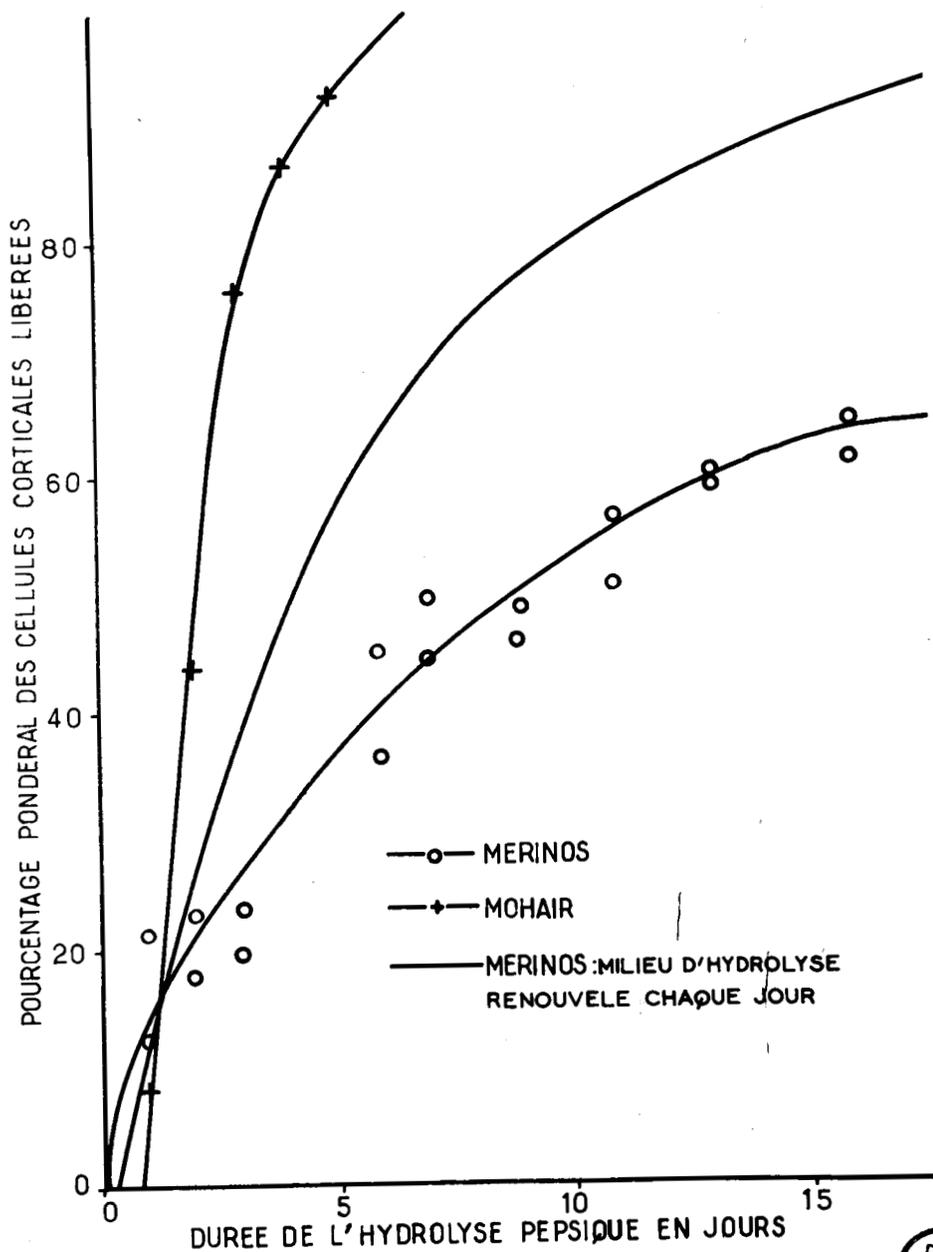


FIGURE 7

Cinétique de libération des cellules corticales par hydrolyse pepsique de la laine.

au 5ème jour d'hydrolyse dans les mêmes conditions. Pour obtenir un taux analogue avec la laine Mérinos, il faut renouveler chaque jour le milieu d'hydrolyse (T 37)

E - RELATION ENTRE LA SOLUBILISATION DU SOUFRE (THIOL + DISULFURE) ET LA LIBERATION DES CELLULES CORTICALES

Au cours de plusieurs expériences de cinétiques d'hydrolyse pepsique nous avons dosé le soufre solubilisé (T 13) en fonction du degré de l'hydrolyse. Dans le cas de la pepsine, on ne solubilise qu'une très faible partie du soufre total contenu dans la laine (4 p. 100 au maximum).

Au cours de ces mêmes hydrolyses, nous avons déterminé le pourcentage de libération des cellules corticales. La courbe représentant la libération des cellules en fonction de la solubilisation du soufre est assez particulière (Figure 8).

La majeure partie du soufre solubilisé (3,5 p. 100) correspond à une période d'hydrolyse où relativement peu de cellules corticales sont libérées (25 à 30 p. 100). La libération du reste des cellules corticales correspond à la solubilisation de seulement 0,5 à 1 p. 100 du soufre total.

F - PROPRIETES DES CELLULES CORTICALES EN FONCTION DU TAUX D'HYDROLYSE PEPSIQUE.

Nous avons tenté de rechercher quelle était l'évolution de certaines des propriétés caractéristiques des cellules corticales libérées au cours de l'hydrolyse pepsique de la laine Mérinos et Mohair. Nous avons retenu à cet effet deux éléments qui nous semblent caractéristiques : d'une part l'estimation de la teneur en soufre (thiol + disulfure) (T 13) de ces cellules et d'autre part le taux de solubilisation des protéines par le thioglycolate de potassium (T 39). Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 9.

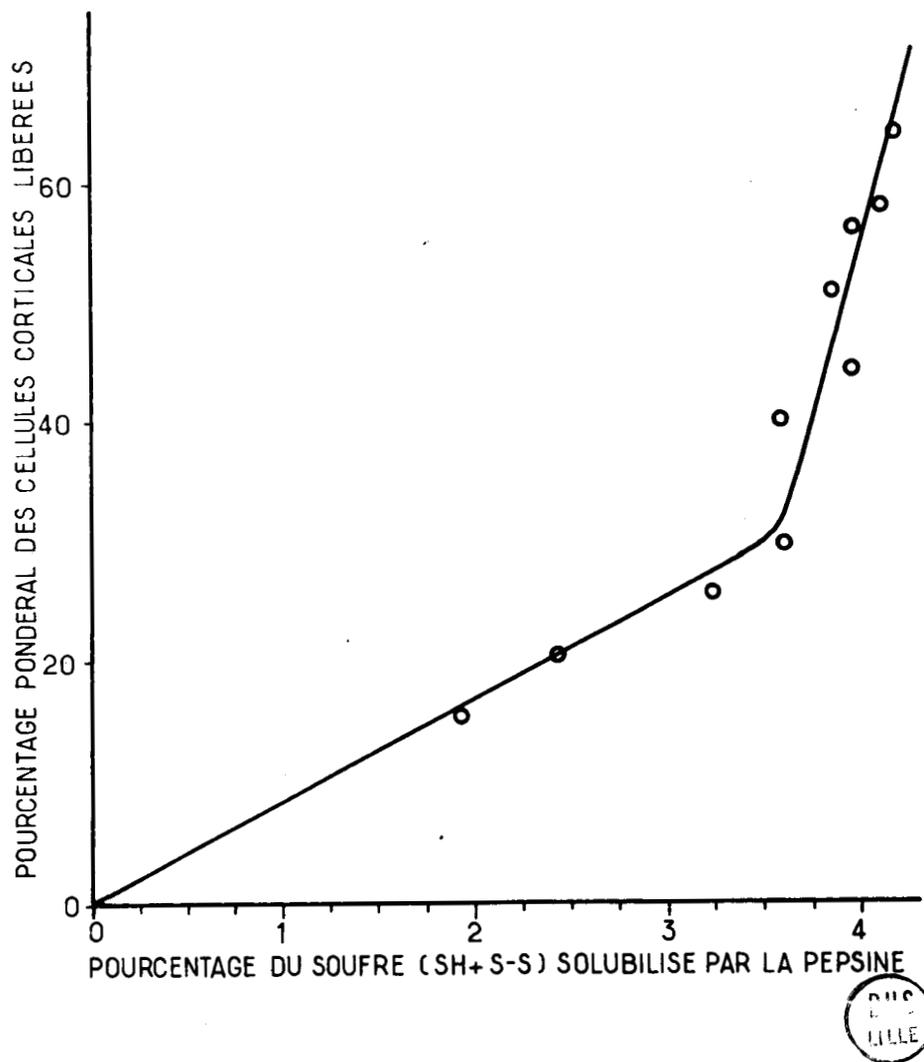


FIGURE 8

Relation entre la solubilisation du soufre (thiol + disulfure) par hydrolyse pepsique et la libération des cellules corticales.

III - DISCUSSION DES RESULTATS

A) METHODE D'ISOLEMENT DE L'ORTHOCORTEX ET DU PARACORTEX

Une des propriétés essentielles du paracortex est d'être plus riche en soufre que l'orthocortex. Certains auteurs considèrent cette richesse en soufre comme un artefact de préparation dû à un enrichissement relatif en cystine causé par l'énucléation préférentielle d'acides-amino (LEVEAU) (48).

D'autres, au contraire, la considèrent comme une propriété propre à cette fraction (ROGERS) (49). Quoi qu'il en soit, cette richesse en cystine permet de différencier ces deux constituants du cortex de la fibre lors de leur isolement.

Les teneurs en soufre des cellules corticales de la laine et du résidu fibreux, à différentes étapes de la désagrégation de la laine hydrolysée par la pepsine, mettent bien en évidence deux régions corticales distinctes (Tableau II). L'une a une faible teneur en soufre, l'autre a une teneur plus élevée. Ces résultats confirment ceux obtenus par LEVEAU (50) sur une laine hydrolysée par l'acide chlorhydrique. Comme cet auteur, on ne peut s'empêcher de remarquer que, plus on avance dans la désagrégation de la fibre, plus la teneur en soufre des cellules libérées se rapproche de celle du résidu fibreux dont elles proviennent. C'est dire que le broyage mécanique ne permet une distinction nette entre les deux types, pauvre et riche en soufre, que pour les cellules libérées au début de la désagrégation. Celles-ci sont en majeure partie constituées d'orthocortex. Des colorations spécifiques au bleu de lactophénol (T 38) effectuées par LEVEAU ont montré à l'examen microscopique que de telles préparations contenaient encore 10 p. 100 de cellules paracorticales.

La pureté morphologique de ces cellules est bien plus grande si elles sont isolées sans faire intervenir de broyage mécanique. Cette libération naturelle et progressive des cellules corticales est possible si la laine est hydrolysée par la pepsine

à pH constant en présence d'acétate de sodium. De cette façon, les cellules orthocorticales sont libérées préférentiellement dans les premiers temps de l'hydrolyse et le rendement en orthocortex est bien plus élevé (Tableau III). Pour contrôler l'état de pureté des cellules obtenues, nous nous sommes fondés sur le taux d'extraction des protéines par le thioglycolate de potassium. A l'aide de ce réactif, les protéines sont principalement extraites de l'orthocortex. Plus les préparations d'orthocortex sont souillées de paracortex, moins le taux d'extraction est élevé.

Le tableau IV rassemble les taux d'extraction de différentes préparations et montre en fonction des critères de pureté énoncés ci-dessus la supériorité du procédé de préparation des cellules par hydrolyse pepsique à pH constant

TABLEAU IV

TAUX D'EXTRACTION AU THIOGLYCOLATE DE POTASSIUM 0,1 M (pH 11 ;
TEMPERATURE 50°C ; DUREE 120 min.)

Laine vierge	Laine hydrolysée par la pepsine en milieu non tamponné			Laine hydrolysée par la pepsine en milieu tamponné		
Laine vierge	Laine hydrolysée	ortho-cortex	para-cortex	Laine hydrolysée	ortho-cortex	Para-cortex
46 %	63 %			56 %		
à	à	75 %	39 %	à	80,5 %	36,5 %
48 %	65 %			57 %		

B) HYDROLYSE PEPSIQUE EN RELATION AVEC LA STRUCTURE MORPHOLOGIQUE DE LA LAINE

Les taux de solubilisation de la laine par la pepsine sont voisins de ceux observés en général par action des autres enzymes. La fibre Mohair est beaucoup moins hydrolysée (8 p. 100) que la laine Mérinos (14 p. 100). Compte tenu de la sensibilité relativement grande de l'orthocortex aux agents d'hydrolyse, il eût été logique que le poil Mohair fût plus hydrolysé : en effet, il est considéré comme presque exclusivement constitué d'orthocortex, alors que la laine Mérinos étudiée (à structure bilatérale) est constituée sensiblement de $\frac{2}{3}$ d'orthocortex et de $\frac{1}{3}$ de paracortex. On peut expliquer cette différence de comportement par la disposition respective des deux constituants morphologiques dans la fibre Mohair. Certains chercheurs indiquent en effet que, dans ce poil, la petite quantité de paracortex se trouve répartie à la périphérie de la fibre. Cette "gaine" de paracortex, très résistant aux agents d'hydrolyse, constituerait alors une barrière de protection. Toutefois, il ne semble pas que cette hypothèse puisse être retenue : en effet, dans les mêmes conditions d'hydrolyse, on observe une désagrégation en cellules corticales plus lente pour la laine Mérinos dans laquelle l'orthocortex et le paracortex sont répartis de chaque côté de la fibre (structure bilatérale) et dont par conséquent l'orthocortex est plus facilement accessible. Au bout de cinq jours d'hydrolyse, le Mohair est presque complètement réduit en cellules corticales, alors que le taux de désagrégation de la laine Mérinos n'atteint que 40 p. 100 (Figure 7). D'autre part, le rendement maximum de cellules corticales est de 60 p. 100 environ pour la laine Mérinos en 10 jours, contre 90 p. 100 pour le Mohair en 5 jours. Ces valeurs sont en bon accord avec les teneurs respectives en orthocortex de ces deux fibres. La désagrégation en fines cellules de paracortex n'est en général

possible que par broyage mécanique ou par renouvellement journalier du milieu d'hydrolyse (Figure 7). De toutes façons elle est beaucoup plus lente que dans la zone orthocorticale. La définition de ces deux zones d'attaque distinctes du cortex de la fibre est confirmée par les extractions des protéines au thioglycolate de potassium et les dosages du soufre effectués sur les cellules corticales libérées aux différents stades de l'hydrolyse. Le taux moyen d'extraction des protéines des cellules corticales du Mohair est de 75 p. 100 (Figure 9), très voisin des 80 p. 100 trouvés pour l'orthocortex purifié de la laine Mérinos (Tableau IV). Ce taux ne baisse ensuite que très lentement jusqu'à la désagrégation complète de la fibre ce qui prouve la structure presque essentiellement orthocorticale du Mohair.

Dans le cas de la laine Mérinos, le taux d'extraction des protéines est aussi le fidèle reflet de la nature des cellules libérées : 70 p. 100 environ de la fibre sont constitués d'orthocortex avec un taux moyen d'extraction de 75 p. 100 (Figure 9) Au delà de 70 p. 100 de désagrégation, on note une brusque chute de ces taux d'extraction, en relation avec une libération de cellules à caractère paracortical.

Des constatations identiques peuvent être faites en se référant à l'évolution de la teneur en soufre des cellules libérées (Figure 9). On vérifie ainsi la valeur de l'extraction au thioglycolate de potassium pour la détermination du caractère morphologique des cellules corticales. Les taux d'extraction au thioglycolate et les teneurs en soufre rapportées sur la figure 9 sont légèrement plus faibles que pour les fractions purifiées du tableau IV. Ceci s'explique par le fait que pour l'étude de la cinétique de libération des cellules corticales, aucune purification n'a été faite en vue de parfaire la séparation orthocortex-paracortex. Le bon accord entre ces résultats et les proportions relatives des constituants morphologiques

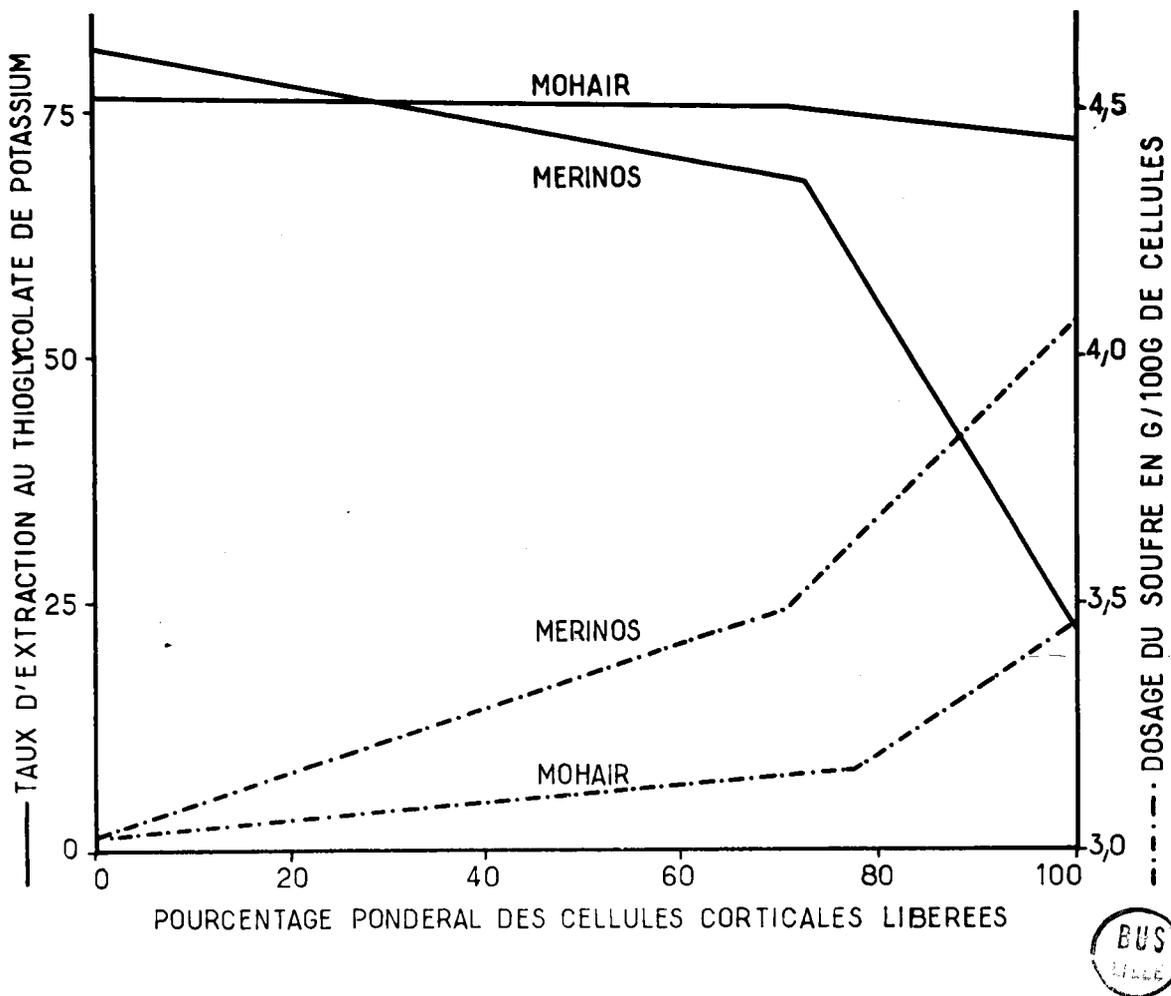


FIGURE 9

Mise en évidence du caractère ortho- et paracortical des cellules corticales libérées à différents stades de l'hydrolyse pepsique. Le caractère orthocortical correspond à un taux d'extraction au thioglycolate élevé et à une faible teneur en soufre.

des fibres étudiées, révélé par l'ensemble des courbes de la figure 9, semble prouver d'une façon certaine qu'il existe réellement une différence de teneur en cystine entre l'orthocortex et le paracortex.

C) RELATION ENTRE LA SOLUBILISATION DE LA CYSTINE ET LA LIBERATION DES CELLULES CORTICALES.

Le soufre cystinique passant en solution au cours de l'hydrolyse pepsique de la laine Mérinos représente environ 4 p. 100 du soufre total de la fibre traitée. Ces résultats sont en bon accord avec ceux trouvés par BISERTE et FIGACHE (51). La courbe de la figure 3 montre que dans le cas de la laine Mérinos l'hydrolyse se fait en deux étapes. Dans la première étape la majeure partie du soufre libéré au cours de l'hydrolyse correspond à un "dégagement" peu important des cellules corticales. Dans la seconde étape, la libération de cellules corticales se fait sans solubilisation importante de soufre. Dans le cas de la fibre Mohair, la quantité de soufre libéré n'est que de 1 à 2 p. 100 du soufre total et peut même être presque nulle pour certains échantillons. Compte tenu de la rapidité de la libération des cellules, une courbe construite sur le même principe que celle de la figure 3 aurait l'allure de la 2ème partie de celle-ci. Un moyen d'expliquer les deux pentes différentes de la courbe de la figure 3 serait d'admettre qu'avant la libération des cellules corticales Mérinos, il est nécessaire d'hydrolyser certaines fractions contenant un taux de cystine relativement plus élevé que celui des protéines hydrolysées ultérieurement. Cette hypothèse serait valable dans le cas de l'hydrolyse de la laine Mérinos, mais pas dans le cas de l'hydrolyse de la fibre Mohair, où on libère très peu de soufre. Il semble bien qu'il faille admettre que la laine Mérinos est un cas particulier et que cette solubilisation du soufre n'est pas nécessaire à la libération des cellules.

Une autre hypothèse consisterait à rattacher ces deux stades distincts dans la solubilisation du soufre de la laine Mérinos à la structure morphologique de cette fibre. Dans la première phase de solubilisation, la cuticule et les membranes cellulaires protègent partiellement le cortex contre l'action de l'enzyme en maintenant une certaine cohésion mécanique, mais en n'empêchant pas une certaine solubilisation des kératines. Dans un second stade, après la destruction lente de cette barrière, le cortex lui-même serait attaqué. Cependant, il ne semble pas que la cuticule limite vraiment le taux de l'hydrolyse et qu'on puisse retenir cette autre explication. En effet, une étude de GREENWOOD et SPEAKMAN (52) montre que, pour une laine broyée finement dans l'azote liquide et dont les fragments sont plus petits que les cellules corticales, le taux d'hydrolyse enzymatique est légèrement augmenté à cause de la dénaturation provoquée par le broyage, mais reste toujours très limité. De plus, le même processus de solubilisation en deux étapes devrait se retrouver dans le cas de la fibre Mohair, ce qui n'est pas observé.

L'explication la plus plausible est qu'on hydrolyse dans un premier stade des constituants protéiques ne faisant pas partie des chaînes kératiniques, qui seraient présents dans la laine Mérinos et absents dans le Mohair. Ces composés n'auraient qu'une influence relativement faible sur la structure générale de la fibre. Dans le second stade, on observait une hydrolyse de certaines régions de la fibre conduisant à la destruction complète de son architecture. Ce mécanisme a l'avantage d'expliquer que le taux d'hydrolyse est plus élevé pour la laine Mérinos que pour le Mohair. D'autre part, l'hypothèse de la présence de certaines fractions kératiniques en plus ou moins grande quantité suivant le type de fibre étudié a été vérifiée par une étude chromatographique et électrophorétique des S-carboxyméthylkératines dérivées de la laine Mérinos et de la fibre Mohair (voir Chapitre V).

CHAPITRE III

COMPARAISON DES S-CARBOXYMETHYLKERATINES EXTRAITES DES CELLULES CORTICALES ET DE LA LAINE VIERGE

I - INTRODUCTION(*)

Le chapitre précédent montre la possibilité d'isoler l'orthocortex de la laine par une simple hydrolyse pepsique. La mise au point de différentes méthodes chromatographiques permet la comparaison des protéines orthocorticales et des protéines extraites directement de la laine vierge (MOSCHETTO et BISERTE) (53). L'utilisation de la filtration sur gel de Sephadex conduit à la mise en évidence et à l'isolement d'une fraction riche en glycoColle, en sérine et en tyrosine (BISERTE et MOSCHETTO) (54) ; (MOSCHETTO et BISERTE) (55).

II - FRACTIONNEMENT DES S-CARBOXYMETHYLKERATINES EXTRAITES DES CELLULES ORTHOCORTICALES (SCMK(OC) SUR DEAE-CELLULOSE ET PAR PRECIPITATION.

A) FRACTIONNEMENT SUR DEAE-CELLULOSE

Au cours d'essais préliminaires, nous avons déterminé que la majeure partie des S-carboxyméthylkératines de la laine pouvait être fixée sur la DEAE-cellulose équilibrée avec un

(*) Dans ce chapitre les termes utilisés dans la nomenclature générale (SCMK, SCMK-A, SCMK-B etc.) sont complétés par les abréviations (LV) ou (OC) pour préciser l'origine des SCMK (laine vierge ou orthocortex) chaque fois qu'une confusion est possible.

tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 6,6. D'ailleurs, le taux de fixation n'est pas nettement influencé par le pH de la solution tampon dans une zone comprise entre 6 et 9. Au contraire, l'élution des protéines fixées peut se faire soit par augmentation de la force ionique du tampon phosphate à pH constant soit par augmentation du pH de l'éluant (T 21).

Au cours de la mise au point de notre système chromatographique nous avons remarqué que le passage sur la colonne, du tampon phosphate 0,005 M permettait d'éluer une petite quantité de protéines non fixées, variable d'un essai à l'autre. L'augmentation linéaire de la concentration de phosphate à pH constant (gradient de concentration de 0,05 M à 0,08 M (T 22)) élue lentement une fraction qui ne représente encore qu'une faible quantité de protéine. L'utilisation de ce gradient a été remplacée dans la technique définitive par le passage d'une solution 0,8 M de phosphate (Figure 10). Les protéines éluées constituent la fraction 2 des chromatographies. L'élution est poursuivie par l'augmentation du pH. On utilise d'abord une solution de carbonate de sodium 0,05 M qui donne deux zones d'élution distinctes (fractions 3 et 4). La chromatographie est enfin terminée à l'aide d'une solution de carbonate de sodium 0,5 M (Fraction 5).

Dans un but préparatif on utilise des colonnes de grandes dimensions. La fraction 3 est alors hétérogène. Elle peut être arbitrairement divisée en sous-fractions (3a, 3b, 3d et 3e). Il en est de même de la fraction 4 que l'on divise en deux sous-fractions (4 et 4') (Figure 11). Les fractions principales ont été purifiées par une seconde chromatographie sur DEAE-cellulose et étudiées en électrophorèse.

La fraction 3d est hétérogène (Figure 12b), mais la proportion du composant le plus rapide a considérablement augmenté par comparaison avec le diagramme électrophorétique d'une protéine brute (Figure 12a).

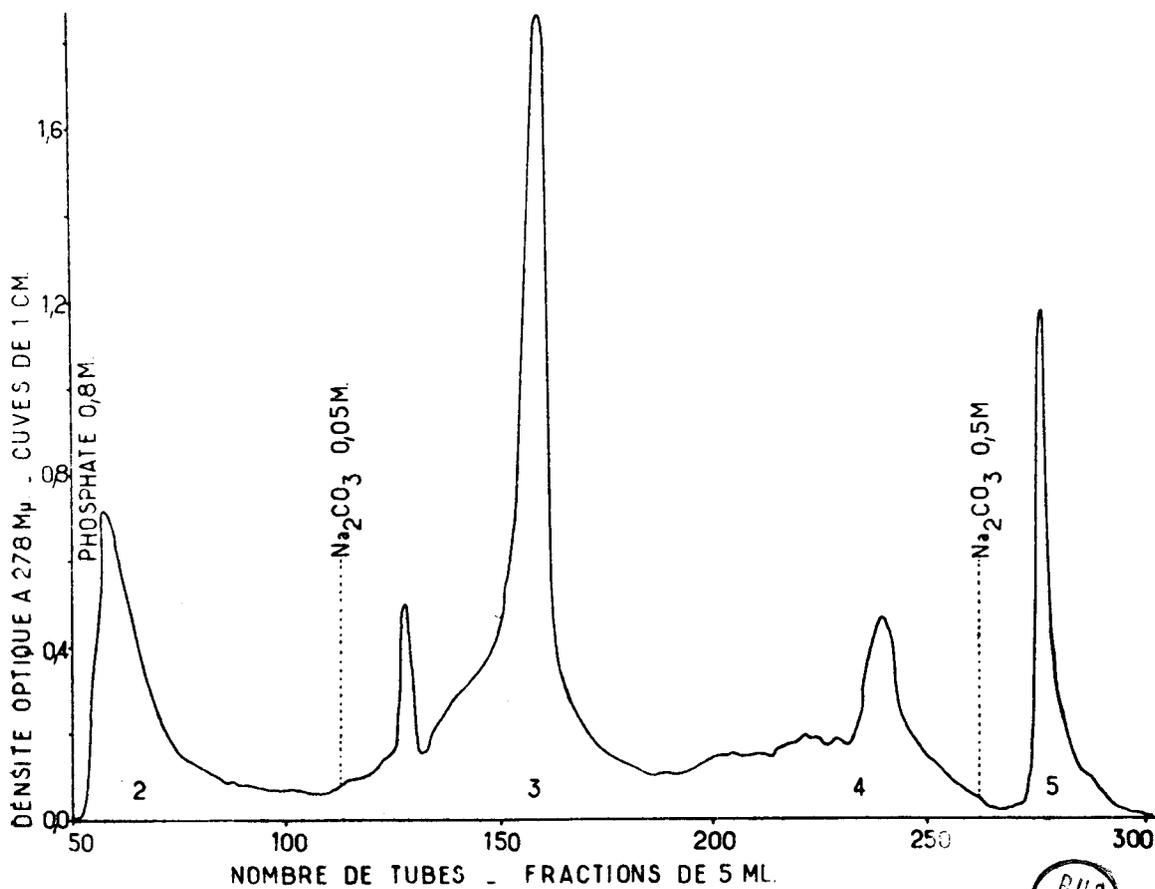
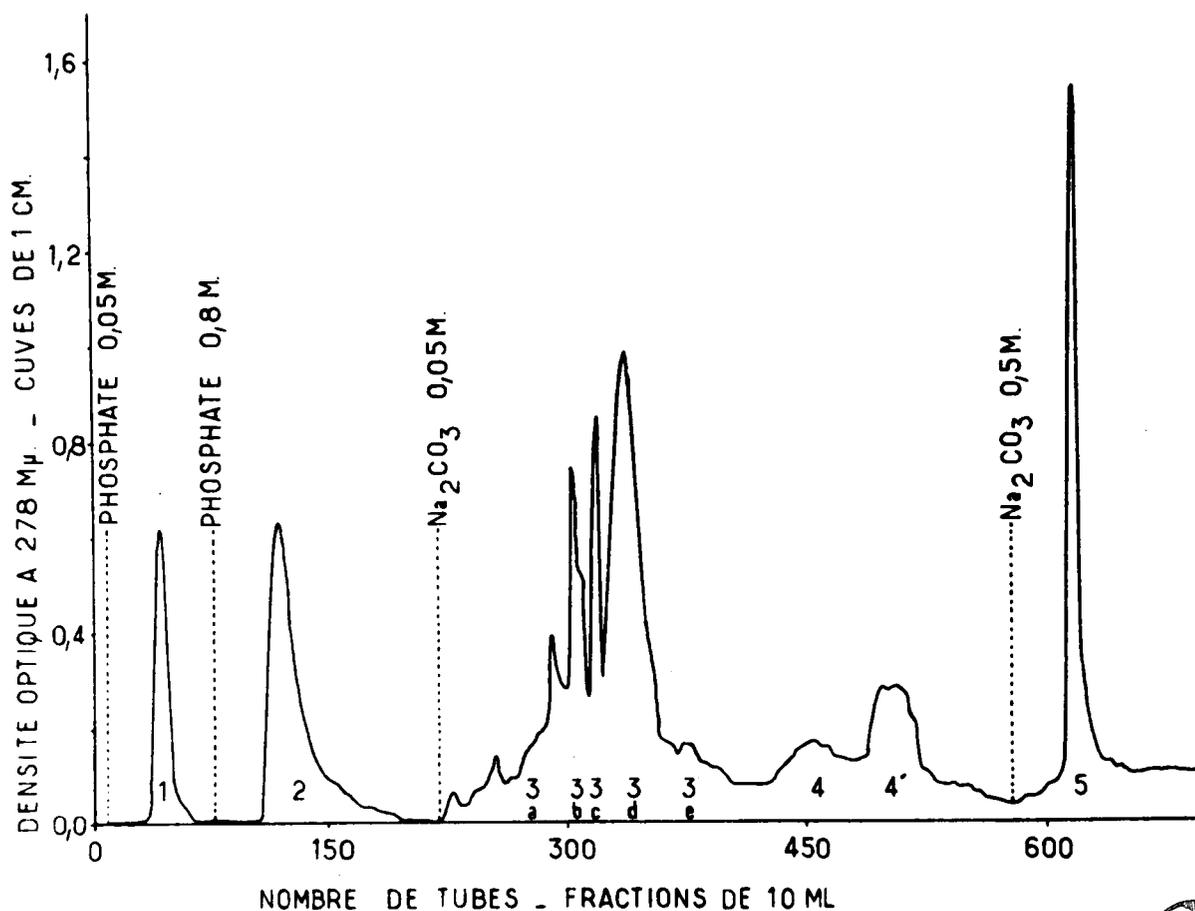


FIGURE 10

CHROMATOGRAPHIE DES SCMK(OC) SUR DEAE-CELLULOSE

Colonne de 22 mm x 230 mm, Pression de tassage 1 kg/cm²,
Poids des protéines déposées : 500 mg ; Débit : 70 ml
à l'heure (T 21)

Pour la signification des chiffres 2, 3, 4 et 5, voir
le texte.



BU
LILLE

FIGURE 11

CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE DES SCMK(OC)

Colonne de 35 mm x 350 mm. Pression de tassage : 1 kg/cm².
 Vitesse d'écoulement : 150 ml/heure (T 21). Le passage des
 tampons phosphate se fait à la température du laboratoire.
 Le reste de la chromatographie est réalisé à 3 - 4°C. Pour
 la signification des chiffres (1, 2 etc.), voir le texte.

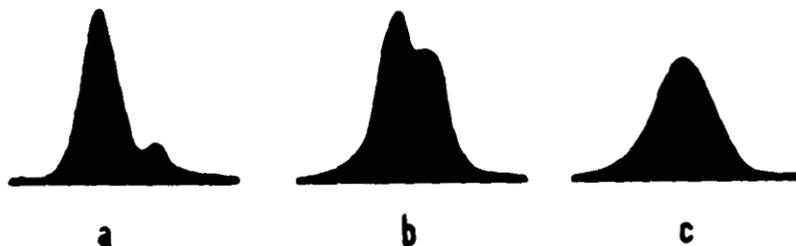


FIGURE 12

Electrophorégramme des protéines des fractions éluées
au cours de la chromatographie préparative (Figure 11)

Diagramme en frontières ascendantes (→→).

Tampon glycocholate de pH 11 et de force ionique 0,1 (T 15)

- a) SCMK(OC) avant chromatographie
- b) SCMK(OC) fraction 3d
- c) SCMK(OC) fraction 4'

La fraction 4' donne un seul pic assez large sur le diagramme (Figure 12c). Elle est donc constituée par un groupe de protéines dont les mobilités électrophorétiques sont relativement voisines.

B) FRACTIONNEMENT PAR PRECIPITATIONS ISOELECTRIQUE ET ACETONIQUE

La chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose dans les conditions décrites ci-dessus permet un certain fractionnement, mais les résultats sont dans l'ensemble relativement peu satisfaisants. Nous avons donc essayé d'isoler la fraction protéique par un autre procédé.

L'acidification à pH 3,9 d'une solution de SCMK(OC) permet la précipitation d'une partie des protéines (T 44) : une telle observation a déjà été faite pour les S-carboxyméthylkératines extraites de la laine vierge par GILLESPIE (56) et elle est à la base d'une méthode de fractionnement d'une solution de SCMK par dialyse contre tampon acide. Dans ce dernier cas, la fraction précipitée (SCMK-A (LV)) est pauvre en soufre, tandis que la fraction surnageante (SCMK-B (LV)) est riche en soufre.

Notre fraction SCMK-A(OC) qui est dérivée des cellules orthocorticales est pauvre en soufre. Elle contient encore une certaine quantité de fractions mineures rapides décelables par électrophorèse libre. Cependant, un fractionnement supplémentaire, par précipitation acétonique (T 45) conduit à une fraction plus homogène en électrophorèse libre désignée par l'abréviation SCMK(PS- α 1).

C) CARACTERISATION CHIMIQUE DE LA FRACTION INSOLUBLE A pH 3,9 ET PURIFIEE.

1) Détermination des groupes α -aminés terminaux libres

La fraction protéique SCMK(PS- α 1) contient une proportion nettement prépondérante de glycofolle en position N-terminale. Nous identifions aussi, mais en quantité moins importante

de la sérine et de la thréonine (T 12)

Rappelons que THOMPSON (57) trouve aussi le glycoColle en position N-terminale dans une préparation de S-carboxyméthyl-kératines (SCMK-A2 de GILLESPIE et LENNOX) (58). Toutefois, dans cette dernière, les auteurs trouvent autant de sérine que de glycoColle en cette position.

2) Détermination de la composition en acides aminés

La composition en acides aminés de la fraction SCMK(PS- α 1) a été déterminée par la méthode des DNP-aminoacides de LEVY (59) (T 11). L'analyse des résultats obtenus nous montre d'une part que la composition de la protéine isolée se distingue de la laine vierge par sa teneur élevée en glycoColle et en sérine (Tableau V). D'autre part, à cause de sa faible teneur en soufre cystinique, on peut rapprocher cette protéine de la fraction SCMK-A2 de GILLESPIE (Tableau V).

III - METHODE GENERALE DE FRACTIONNEMENT DES SCMK ET D'ISOLEMENT DES SCMK-A (*)

La chromatographie sur DEAE-cellulose et la méthode de précipitation isoélectrique montrent bien l'hétérogénéité des SCMK mais ne nous ont pas permis d'obtenir des fractions parfaitement homogènes en électrophorèse libre. Pour compléter le fractionnement, nous avons utilisé la méthode de filtration sur gel de Sephadex (T 23) (T 24).

(*) Nous rappelons que les SCMK représentent l'ensemble des kératines extraites de la laine et carboxyméthylées, les SCMK-A constituant la fraction des SCMK insolubles en milieu acide et les SCMK-B la fraction soluble.

TABLEAU V

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES FRACTIONS OBTENUES PAR
CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G75

(nombre de résidus d'amino-acides pour 100 amino-acides dosés)

	SCMK-A(OC) (laine RP)	SCMK-A(OC) (F1) (2 x G75)** (laine RP)	SCMK-A(OC) (F1) (2 x G75)** (laine SW)	SCMK(PS-α1) *** (laine RP)	SCMK-A2****
	1	2	3	4	5
Alanine	6,9	7,6	8,1	6,6	6,9
Arginine	5,8	3,7	8,6	1,8	8,0
Ac.aspartique	8,7	9,6	9,8	8,9	9,5
Ac.cystéique	0,6	0,2	0,3	-	-
1/2 cystine	1,8	traces	0,6	1,4	-
Ac.glutamique	14,3	16,8	16,1	16,2	14,7
Glycocolle	11,9	7,9	7,5	11,5	7,1
Histidine	1,3	0,2	0,8	1,1	0,8
Leucines	12,5	13,3	12,6	12,0	14,1
Lysine	2,9	3,1	2,8	3,0	4,2
Méthionine	traces	traces	-	traces	-
Phénylalanine	3,2	2,5	2,3	3,2	2,9
Proline	5,3	7,1	4,2	5,6	3,6
Sérine	7,7	9,7	9,9	12,0	8,5
Thréonine	4,5	5,1	5,9	6,0	4,9
Tyrosine	2,9	1,9	traces	0,8	3,7
Valine	5,7	5,6	6,0	5,1	5,8
S-carboxy- méthyl cystéine	3,0	5,7	4,5	4,8	5,3
Equivalent 1/2 cystine totale	5,4	5,9	5,4	6,2	5,3

(*) L'indication RP indique que la laine utilisée est du ruban peigné et SW qu'il s'agit d'une laine en toison spécialement traitée pour les recherches (T 1)

(**) les abréviations 1 x G75 et 2 x G75 correspondent à des fractions obtenues respectivement après une ou deux chromatographies sur Sephadex G75.

(***) Fraction protéique obtenue par fractionnement acétonique (Chapitre III)

(****) Fraction protéique (dite pauvre en soufre) abtenue par fractionnement des SCMK(LV) par l'acétate de zinc (GILLESPIE et LENNOX) (60)

LAINNE VIERGE

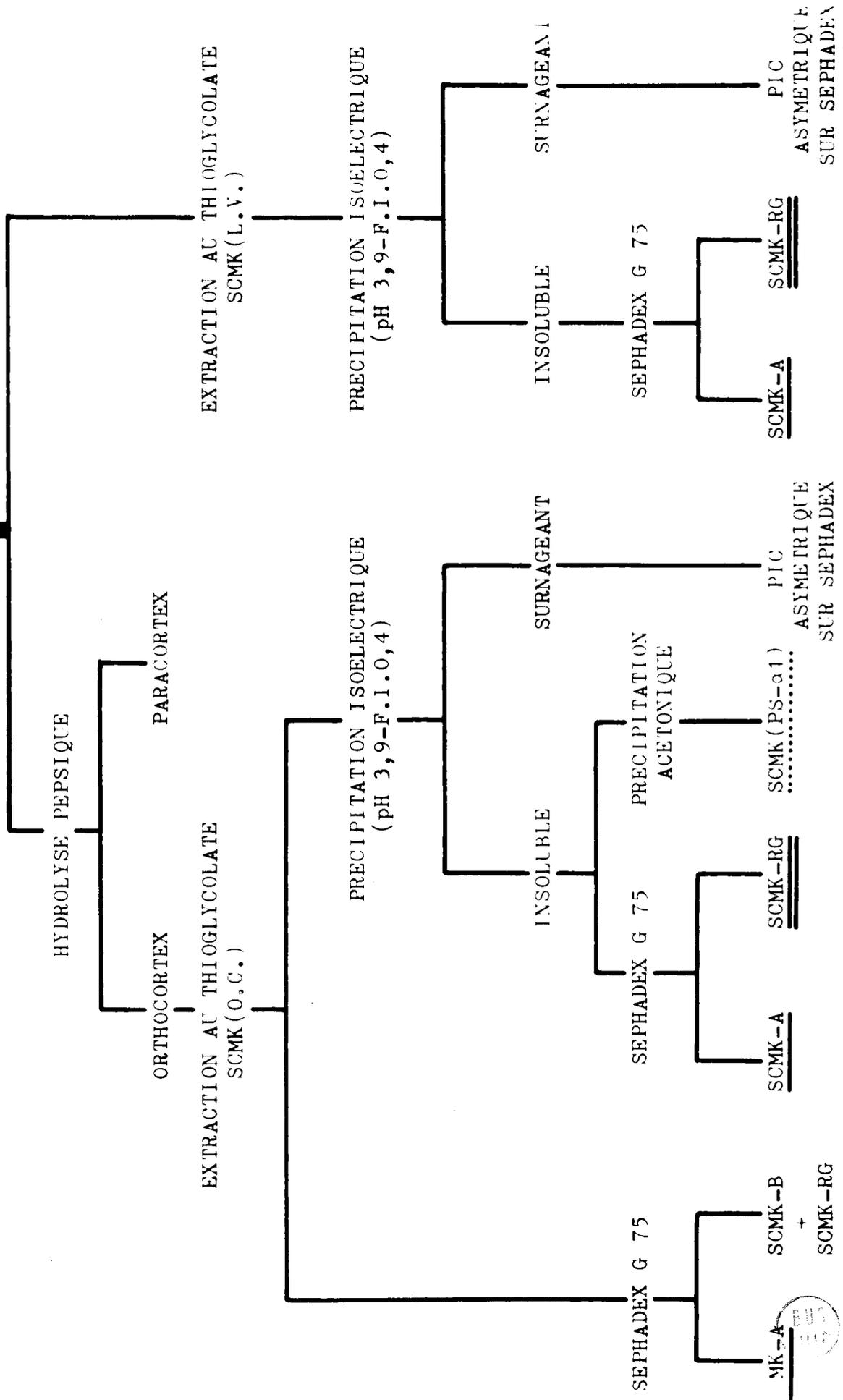


TABLEAU VI

Le plan général de fractionnement que nous avons suivi est résumé dans le tableau VI. L'obtention de SCMK-A homogènes en électrophorèse libre et en ultracentrifugation est rendue possible par l'association de la précipitation isoélectrique à pH 3,9 et de la filtration sur gel de Sephadex.

A) FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES PROTEINES EXTRAITES DES CELLULES ORTHOCORTICALES

1°) Chromatographie des SCMK(OC)

Les S-carboxyméthylkératines brutes, qui sont hétérogènes en électrophorèse libre (Figure 13a), ont été soumises à un fractionnement par chromatographie sur Sephadex G75 (T 24). Deux fractions peuvent être obtenues (Figure 14a). La fraction 1, qui contient la majeure partie des protéines, est encore hétérogène en électrophorèse libre (Figure 13b). Elle est donc rechromatographiée dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 14b). La fraction correspondant au pic principal (Figure 14a) est cette fois pratiquement homogène en électrophorèse libre (Figure 13c). L'élimination progressive de la fraction riche en soufre au cours des différentes chromatographies des SCMK sur Sephadex peut être mise en parallèle avec l'évolution des mobilités électrophorétiques (Tableau VII, colonne de gauche).

TABLEAU VII

EVOLUTION DES MOBILITES ELECTROPHORETIQUES DES SCMK(OC) EN FONCTION DU FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX G75 (*)

SCMK(OC)	9,3	SCMK-A(OC)	9,2
SCMK(OC)(F1)	9,15	SCMK-A(OC)(F1) 1 x G75	8,85
SCMK(OC)(F1) 2 x G75	8,8	SCMK-A(OC)(F1) 2 x G75	8,65

(*) Les mobilités sont exprimées en $\text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \times 10^{-5}$ (T 15). Elles sont calculées d'après les déplacements de la frontière ascendante. Les protéines étudiées proviennent toutes de la laine SW 286 (T 1).

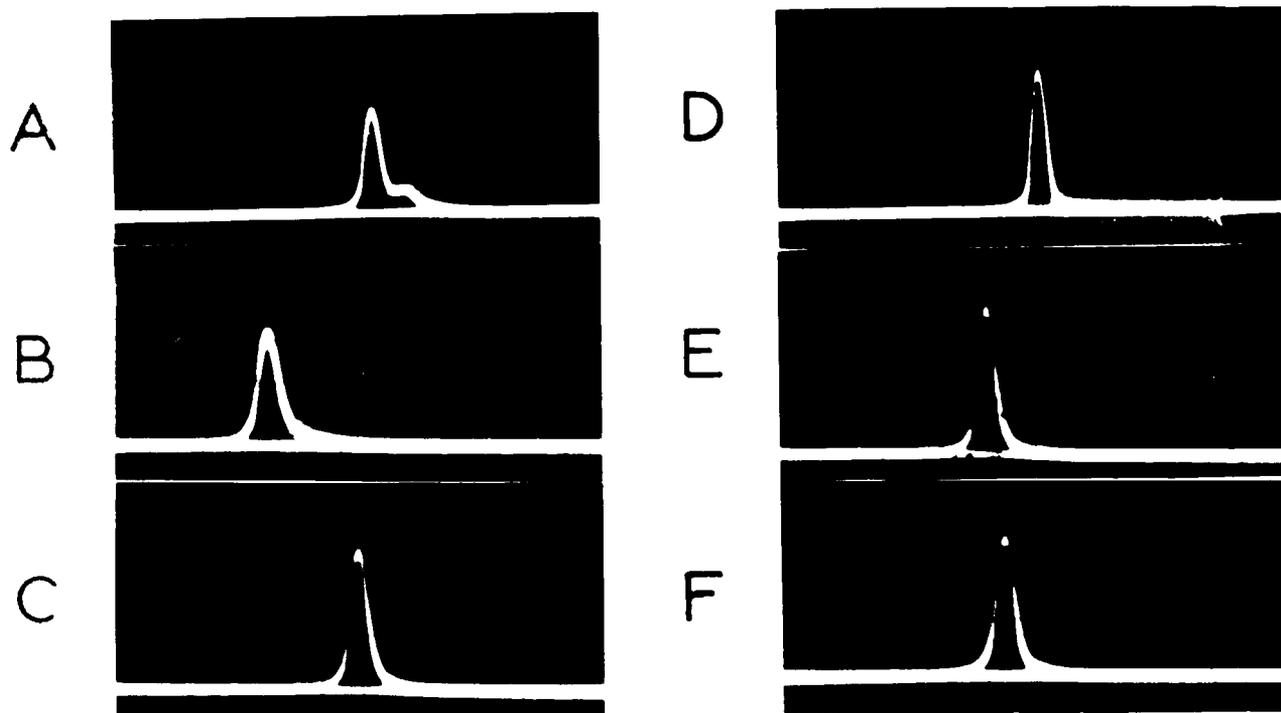


FIGURE 13

Diagrammes d'électrophorèse libre (frontières ascendantes →) des S-carboxyméthylkératines extraites des cellules orthocorticales de la laine. Tampon glyocolle de pH 11,0 (force ionique 0,1). Concentration de la solution de protéines dans le tampon : 1,5 p. 100 (poids/volume). Les protéines utilisées n'ont été dialysées qu'une fois et sont utilisées aussitôt après lyophilisation.

- A : SCMK(OC)
- B : SCMK(OC)(F1)(1 x G75)
- C : SCMK(OC)(F1)(2 x G75)
- D : SCMK-A(OC)
- E : SCMK-A(OC)(F1)(1 x G75)
- F : SCMK-A(OC)(F1)(2 x G75)

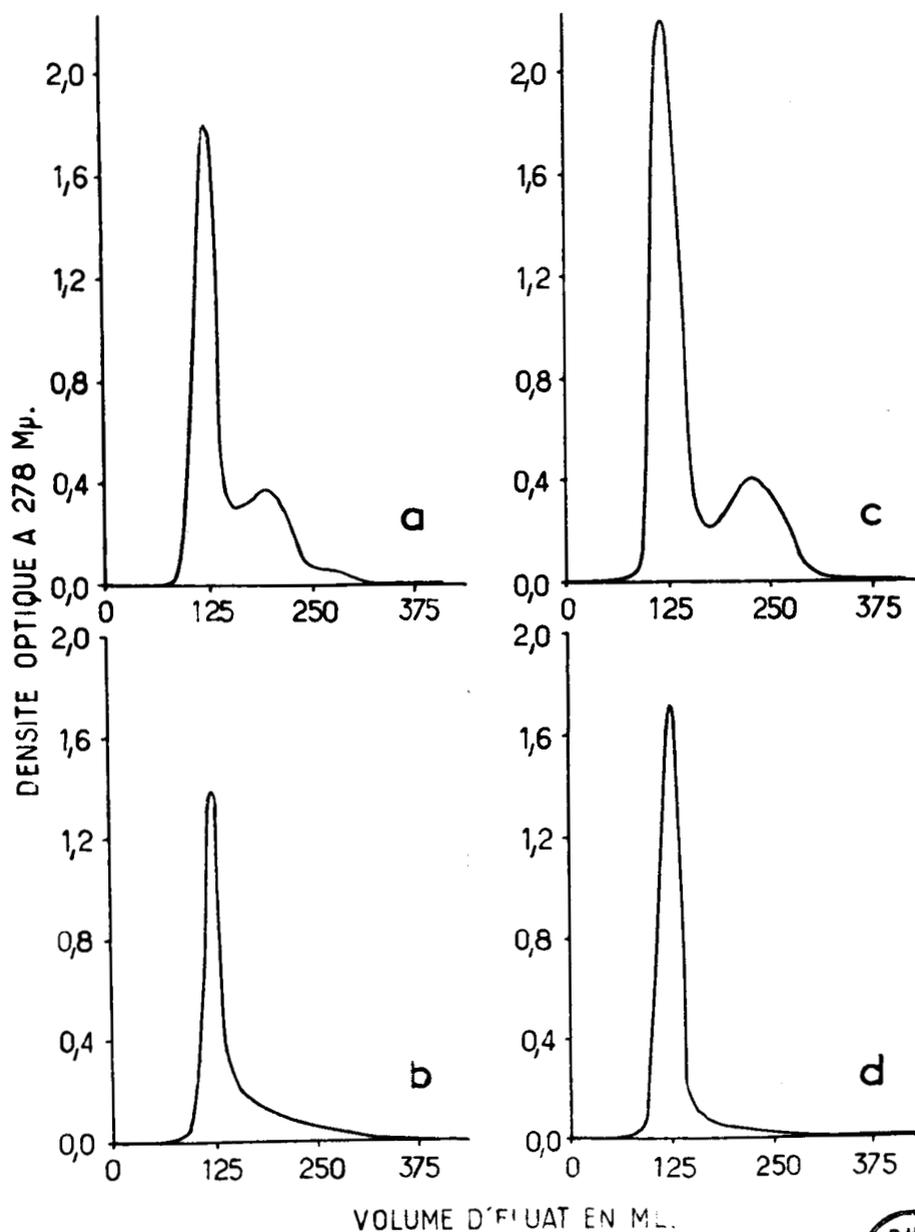


FIGURE 14

Chromatographie de filtration sur gel des S-carboxyméthyl-kératines (SCMK(OC) et SCMK-A(OC)). Colonnes de Sephadex G75 de 3,5 cm x 45 cm ; Dépôt : 150 mg de protéines. Fractions de 3,3 ml.

- a : Chromatographie de SCMK(OC)
- b : Rechromatographie de la fraction 1 de SCMK(OC)
- c : Chromatographie de SCMK-A(OC)
- d : Rechromatographie de la fraction 1 de SCMK-A(OC).



2^o) Chromatographie des SCMK-A(OC)

La fraction SCMK-A(OC) obtenue par précipitation des SCMK(OC) à pH 3,9 est hétérogène en électrophorèse libre (Figure 13d). La chromatographie de cette fraction sur Sephadex G75 est très comparable à celle de la fraction SCMK(OC) (Figure 14c). Toutefois, la fraction 2 correspondante contient beaucoup moins de protéines. La fraction 1 de cette première chromatographie des SCMK-A(OC) est pratiquement homogène en électrophorèse libre (Figure 13e). Une seconde chromatographie permet une purification supplémentaire (Figure 14d) qui conduit à une protéine parfaitement homogène en électrophorèse libre (Figure 13f). Comme dans le cas du fractionnement des SCMK(OC) on remarque que l'élimination progressive des protéines du 2^{ème} pic chromatographique des SCMK-A(OC) peut être mise en parallèle avec une diminution des mobilités électrophorétiques (Tableau VII, colonne de droite).

La fraction purifiée des SCMK-A(OC) est également homogène en ultracentrifugation aux concentrations de 10 mg/ml et de 5 mg/ml (T 20). A la concentration de 7,5 mg/ml il est possible de déceler une légère asymétrie de la base du pic : la présence d'un composant très mineur ne peut donc être éliminée. La constante de sédimentation est de 4,6 Unités Svedberg à 20°C pour une dilution infinie.

3^o) Chromatographie des SCMK-B(OC)

La fraction des SCMK-B(OC) solubles à pH 3,9 est également hétérogène en électrophorèse libre (Figure 15b). Par chromatographie sur Sephadex G75 (Figure 15a) on n'obtient qu'un pic majeur qui est étalé et asymétrique. Même après rechromatographie, on ne peut obtenir des fractions homogènes.

B) FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES PROTEINES EXTRAITES DE LA LAINE VIERGE

Les protéines extraites par le thioglycolate à partir de la laine vierge sont hétérogènes en électrophorèse libre

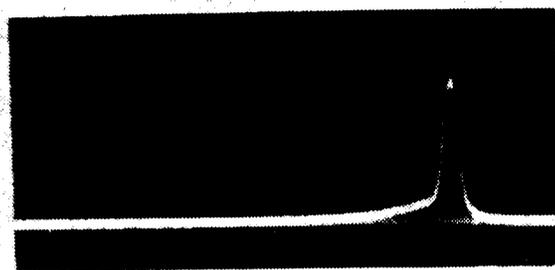
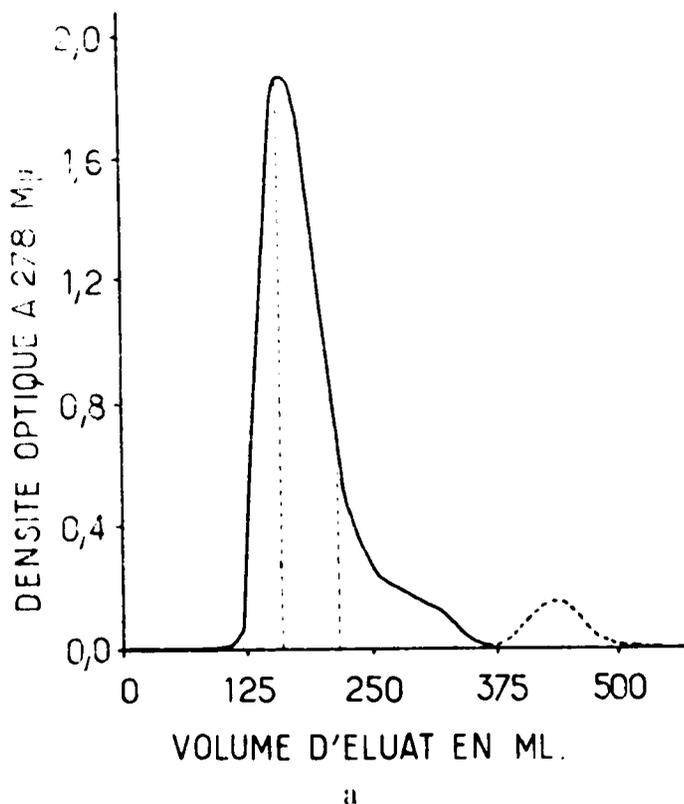


FIGURE 15

A : Chromatographie de gel-filtration de la fraction SCMK-B(OC) ;(mêmes conditions opératoires que dans la figure 14).

B : Electrophorèse libre de SCMK-B(OC) (mêmes conditions opératoires que dans la figure 13).

(Figure 16a). Un premier fractionnement est obtenu par précipitation isoélectrique à pH 3,9 suivant la technique de GILLESPIE et al. (61). La fraction insoluble à pH 3,9 (SCMK-A(LV)) est hétérogène en électrophorèse libre (Figure 16b) et se sépare en chromatographie sur Sephadex G75 en deux sous-fractions F1 et F2 (Figure 17a). Après une seconde chromatographie de la sous-fraction F1, les SCMK-A(LV) ainsi obtenues sont homogènes en électrophorèse libre. (Figure 16c).

La fraction soluble à pH 3,9 (SCMK-B(LV)) est chromatographiée sur Sephadex G75, elle donne un diagramme d'éluion (Figure 17b) semblable à celui obtenu pour SCMK-B(OC) (Figure 15).

IV - ETUDE CHIMIQUE DES SCMK.

A) ETUDE DES PROTEINES EXTRAITES DES CELLULES ORTHOCORTICALES

1°) Composition en acides aminés

a) SCMK-A(OC)

Dans le tableau V, nous avons rassemblé les différentes compositions de la fraction SCMK-A obtenue par précipitation isoélectrique et de la fraction SCMK-A à différents stades de purification par chromatographie de gel-filtration. A part un abaissement très net de la teneur en glycoColle, la fraction SCMK-A(F1) a la composition générale des α -kératines. En effet, la comparaison est possible avec la fraction SCMK-A2 (tableau V ; colonne 5), extraite de la laine vierge par GILLESPIE et LENNOX (62). Compte tenu des méthodes différentes employées pour les dosages, les écarts de composition observés sont mineurs. Pour la comparaison des teneurs en S-carboxyméthylcystéine, il convient de tenir compte de la présence d'acide cystéique et de cystine résiduels (Voir Tableau V, Equivalent 1/2 cystine totale).

La fraction 2 (SCMK-A(OC)(F2)) obtenue par chromatographie sur Sephadex G75 est au contraire très différente des α -kératines (tableau VIII). Elle contient une très grande quantité de glycoColle, ainsi qu'une teneur en sérine assez importante.

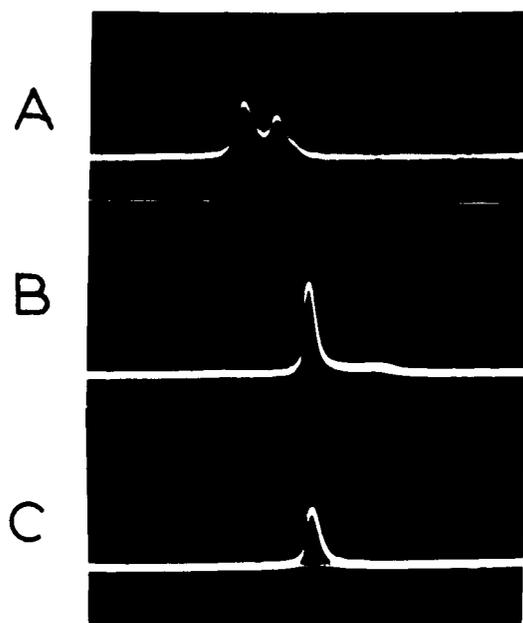


FIGURE 16

Diagramme d'électrophorèse libre (frontières ascendantes \longrightarrow) des S-carboxyméthylkératines extraites de la laine vierge (16 h à 0°C). Mêmes conditions opératoires que dans la figure 13.

A : SCMK(LV)

B : SCMK-A(LV)

C : SCMK-A(LV)(F1) : après deux chromatographies sur Sephadex G75 (concentration de la solution protéique pour l'électrophorèse : 0,9 g. p. 100).

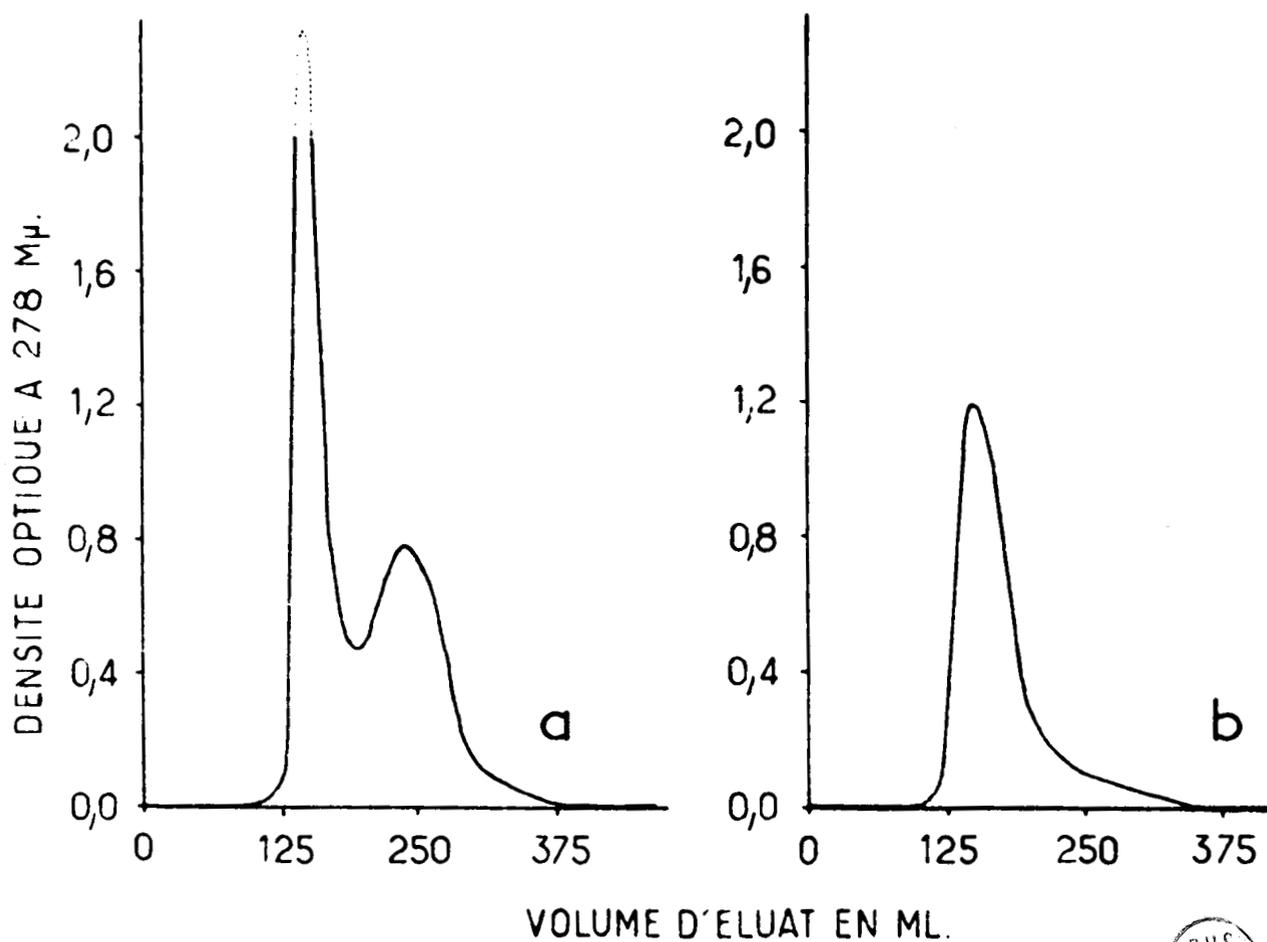


FIGURE 17

Chromatographie de gel-filtration des S-carboxyméthyl-kératines extraites de la laine vierge. Mêmes conditions opératoires que dans la figure 14.

a : SCMK-A(LV) ; b : SCMK-B(LV).

TABLEAU VIII

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES FRACTIONS OBTENUES

PAR CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G75

(Nombre de résidus d'amino-acides pour 100 amino-acides dosés)

	SCMK(OC) (F2) (Laine SW)	SCMK-A(OC) (F2) * (Laine RP)	SCMK-A(OC) (F2)* (Laine RP)	SCMK-A(OC) (F2) * (Laine SW)	SCMK-A(LV) (F2)** (Laine SW)
	1	2	3	4	5
Alanine	3,1	2,6	1,6	2,8	1,7
Arginine	5,4	6,1	2,8	8,4	5,6
Ac.aspartique	4,6	6,4	4,2	4,2	3,9
Ac.cystéique	0,5	1,8	0,2	0,6	0,4
Cystine	1,5	0,7	0,3	0,0	0,7
Ac.glutamique	5,2	5,0	3,0	5,5	1,9
Glycocolle	17,7	39,5	33,8	24,0	34,4
Histidine	0,8	0,7	2,9	3,0	5,6
Leucines	7,3	4,6	6,8	6,9	5,8
Lysine	0,5	0,2	0,1	0,3	0,1
Phénylalanine	4,5	4,9	7,1	4,8	5,9
Proline	11,2	6,8	6,1	6,8	6,5
Sérine	13,1	13,3	12,6	14,1	13,3
Thréonine	7,2	3,0	2,6	4,3	2,9
Tyrosine	3,5	0,5	8,1	3,9	0,9
Valine	4,6	1,8	2,2	2,8	2,0
S-carboxy- méthylcystéine	9,1	2,1	5,5	7,5	8,1

(*) Les préparations des colonnes 2 et 3 proviennent respectivement d'une seule chromatographie, celle de la colonne 4 provient de la réunion des éluats de 12 chromatographies.

(**) Cette fraction provient d'une laine traitée par le thioglycolate pendant 16 heures à 0°C.

Malgré l'existence de variations suivant l'origine des préparations cette fraction est toujours caractérisée par sa haute teneur en glyco-colle et en sérine. Ces deux caractéristiques essentielles sont valables aussi pour les fractions 2 obtenues par chromatographie de SCMK(OC) et de SCMK-A(LV) (colonnes 1 et 5 du tableau VIII. Cette fraction 2 se caractérise aussi par sa richesse en tyrosine (tableau XII, MOSCHETTO et al. (63) (*). Cette fraction est constituée comme nous le verrons plus loin d'un groupe de protéines auxquelles nous avons donné le nom général de SCMK-RG pour rappeler leur grande richesse en glyco-colle. Ces protéines sont étudiées plus en détail au chapitre V.

D'autre part, la fraction SCMK-A(OC)(2 x G 75), qui est homogène en électrophorèse libre et dont la composition en acides aminés a été rapportée dans le tableau V (colonne 3) a été rechromatographiée sur Sephadex G200 (**). Elle est éluée sous la forme d'un pic qui présente une légère asymétrie. La composition en acides aminés déterminée sur deux sous-fractions isolées arbitrairement par découpage du pic a révélé la présence d'une petite quantité de cystine résiduelle dans les éluats correspondant au début du pic. De plus, les SCMK-A, malgré leur homogénéité en électrophorèse libre, se sont révélées hétérogènes en électrophorèse en gel d'amidon (T 17) (Figure 18).

b) SCMK-B(OC) : Les résultats préliminaires obtenus par chromatographie des SCMK-B nous montrent qu'il est possible d'obtenir un certain fractionnement de la fraction riche en soufre. Un fractionnement arbitraire révèle des variations de la composition en amino-acides, en particulier pour la fraction 3 (Figure 15a).

(*) Il faut cependant noter que le dosage de la tyrosine par la méthode des DNP-aminoacides est particulièrement délicate. Les résultats sont plus valables avec la méthode de MOORE et STEIN (T 5).

(**) La colonne utilisée mesure 2 cm de diamètre et 23 cm de hauteur. Le Sephadex employé pour cette chromatographie ne possède pas les propriétés du Sephadex G200 perlé qui n'a été commercialisé qu'après l'exécution de nos essais (voir les résultats du chapitre V).



FIGURE 18

Electrophorèse sur gel d'amidon des fractions de SCM(LV) obtenues sur Sephadex G75 (T 17). Les SCM ont été extraites à 0°C pendant 16 heures.

Sens de migration : cathode (bas de la figure) vers anode.

(A et B) : SCM-B : Ces deux électrophorèses mettent en évidence des différences de comportement électrophorétique des SCM-B dues à de faibles variations de la force ionique au cours du fractionnement des SCM par précipitation à pH 3,9.

C : SCM-A ;

D : SCM-A après deux passages sur Sephadex G75 ;

E : SCM-RG (fraction 2 sur Sephadex G75, partie insoluble à pH 3,9, rechromatographiée sur Sephadex G75) ;

F : Mélange artificiel (50 p. 100, p/p) des fractions D et E.

Dans l'ensemble, cependant ces fractions ne diffèrent pas beaucoup les unes des autres, mises à part des variations importantes de la teneur en S-carboxyméthylcystéine (Tableau IX).

2°) Amino-acides en position N-terminale

La détermination des acides aminés en position N-terminale (Tableau X) montre que la fraction SCM-K-A(OC), même après deux chromatographies, contient encore plusieurs amino-acides N-terminaux. Toutefois, au cours du fractionnement chromatographique, on note une augmentation de la proportion de la somme (acide glutamique + acide aspartique) et une diminution de la thréonine, comparativement à la fraction insoluble de départ.

Cette étude n'a d'intérêt que sur des protéines présentant certains critères de pureté : c'est pourquoi nous ne l'avons pas faite sur la fraction SCM-K-B qui est hétérogène (voir plus haut).

Le cas des protéines riches en glycocolle du tableau VIII est un peu différent. Certes nous avons déjà signalé la variabilité de la composition en amino-acides, mais la prédominance du glycocolle, de la sérine et de la tyrosine justifiait la recherche des groupes terminaux. Comme on pouvait s'y attendre, nous trouvons plusieurs acides aminés en position N-terminale, mais le glycocolle et la sérine prédominent très nettement.

B) COMPOSITION DES PROTEINES EXTRAITES DE LA LAINE VIERGE

La fraction SCM-K-A dérivée des kératines de la laine vierge, obtenue par le couplage de la précipitation isoélectrique et de la filtration sur gel de Sephadex G75, est pauvre en soufre et présente des critères de pureté très satisfaisants. En vue d'une caractérisation plus précise, sa composition en amino-acides a été déterminée par la méthode de MOORE et STEIN (Tableau XI).

C) DISCUSSION

La chromatographie sur DEAE-cellulose utilisant le

TABLEAU IX

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES FRACTIONS SCMK-B(OC)

(Nombre de résidus d'amino-acides pour 100 amino-acides dosés)

	SCMK-B(OC) brutes (Laine SW)	SCMK-B(OC) (F1) (*) (Laine SW)	SCMK-B(OC) (F2) (*) (Laine SW)	SCMK-B(OC) (F3) (*) (Laine SW)
	1	2	3	4
Alanine	3,8	3,2	3,2	4,0
Arginine	5,0	6,3	6,5	10,1
Ac.aspartique	2,3	1,5	2,6	4,0
Ac.cystéique	0,5	0,2	0,1	0,7
Cystine	1,9	0,9	0,8	2,4
Ac.glutamique	8,5	10,7	9,0	7,6
Glycocolle	7,6	6,2	5,9	7,9
Histidine	0,7	0,2	0,6	1,2
Leucines	6,4	4,8	6,6	5,1
Lysine	0,4	0,2	0,2	0,1
Méthionine	-	-	-	-
Phénylalanine	1,6	1,0	1,7	1,5
Proline	15,1	15,2	14,5	14,2
Sérine	13,5	14,0	12,5	13,5
Thréonine	10,8	11,1	10,7	10,1
Tyrosine	0,3	-	traces	traces
Valine	5,5	5,1	5,5	4,9
S-carboxyméthyl- cystéine	15,1	19,1	17,4	12,3
X(lysine)(**)	0,3	0,4	0,2	0,2
X(proline)(**)	0,7	-	2,0	-

(*) Les traits pointillés verticaux de la figure 15 permettent de localiser ces différentes fractions.

(**) X(lysine) et X(proline) correspondent à des taches non identifiées qui se localisent à côté de la lysine et de la proline sur les chromatogrammes bidimensionnels ; leur nature chimique est entièrement inconnue.

BUS

TABEAU X

EVOLUTION DES TAUX D'AMINO-ACIDES EN POSITION N-TERMINALE EN FONCTION DU

FRACTIONNEMENT DE SCMK-A (*)

(Résultats en pourcentage par rapport à l'ensemble)

Préparation	Alanine	Ac. aspar- tique et glutamique	Glycocolle	Leucine	Phényl- alanine	Sérine	Thréo- nine	Valine	X-lysine (****)
SCMK-A(OC) (**)	2,5	15,4	10,8	5,6	1,4	19,1	27,0	2,9	15,3
SCMK-A(OC) (F1)***	5,7	31,4	10,7	8,6	traces	24,3	12,9	traces	6,4

(*) Résultats non corrigés pour la destruction au cours de l'hydrolyse

(**) Moyenne de 4 analyses

(***) Moyenne de 2 analyses ; les protéines ont subi 2 chromatographies

(****) Il s'agit d'une tache jaune-marron se trouvant légèrement à droite de la lysine et qui provient peut-être d'une réaction secondaire de l'acide monoiodoacétique avec certains amino-acides (GUNDLACH, STEIN et MOORE) (67)

DUS
LILLE

TABLEAU XICOMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PROTEINES PAUVRES
EN SOUFRE EXTRAITES DE LA LAINE VIERGE(résultats en grammes de résidus pour 100 g de protéines)(*)
TENEUR EN AZOTE : 16,80

	Hydrolysats de	Hydrolysats de	Moyenne
	24 heures	72 heures	
	1	2	3
Alanine	4,14	4,21	4,17
Arginine	10,21	10,41	10,31
Ac.aspartique	8,96	8,85	8,90
SCM-cystéine	7,55	7,57	7,56
1/2-cystine	0,34	0,31	0,33
Ac.glutamique	17,89	17,96	17,93
Glycocolle	3,63	3,61	3,62
Histidine	0,82	0,88	0,85
Isoleucine	2,89	3,72	3,72
Leucine	9,13	9,14	9,13
Lysine	3,49	3,73	3,61
Méthionine	0,48	0,33	0,55 (***)
Phénylalanine	3,41	3,39	3,40
Proline	3,46	3,29	3,38
Sérine	7,85	7,15	8,20 (***)
Thréonine	4,71	4,49	4,82 (***)
Tyrosine	5,17	5,20	5,19
Valine	4,13	4,93	4,93 (**)
Ammoniaque	2,46	2,50	2,48

BUT
1111

(*) Pour chaque temps d'hydrolyse on fait deux hydrolysats et deux dosages sur chaque hydrolysats. Les analyses sont faites selon MOORE et STEIN (T 5). Les protéines analysées représentent le groupe complet des SCM-A à son stade maximum de pureté. Ceci justifiait une détermination très précise de la composition en amino-acides. Le mode d'expression des résultats utilisé permet d'effectuer les corrections pour la destruction des amino-acides en cours d'hydrolyse. Pour permettre la comparaison avec les autres dosages, ces résultats sont partiellement repris dans le tableau XII et exprimés de la manière habituelle en nombre de résidus d' amino-acides p. 100.

(**) La valeur retenue est celle obtenue après 72 heures d'hydrolyse.

(***) Résultats extrapolés pour un temps d'hydrolyse nul.

carbonate de sodium comme milieu d'élution montre la grande hétérogénéité des SCMK extraites des cellules corticales. O'DONNELL et THOMPSON (64) arrivent à la même conclusion par chromatographie des SCMK de la laine vierge sur DEAE-cellulose avec élution par gradient discontinu de chlorure de sodium. Comme pour les SCMK extraites de la laine vierge, (WOODS (65), GILLESPIE et al. (66)), ces protéines se divisent en deux groupes principaux : les SCMK-A pauvres en soufre et les SCMK-B riches en soufre.

La chromatographie de gel-filtration montre en plus que les SCMK-A contiennent au moins une autre fraction mineure bien caractérisée et composée de protéines riches en glycolle, en sérine et en tyrosine, que nous appelons SCMK riches en glycolle (ou SCMK-RG par abréviation). Elle correspond à un mélange de plusieurs protéines comme le montrent les électrophorèses sur gel d'amidon de la figure 18 (Fraction E). Signalons que cette fraction SCMK-RG peut également être mise en évidence par chromatographie sur DEAE-cellulose en milieu alcalin (TRIS 0,05 M de pH 10,4). Ce type de chromatographie que nous étudierons au Chapitre V est très reproductible. Mise au point sur les SCMK(LV) (MOSCHETTO et BISERTE) (68) ; cette chromatographie est particulièrement bien adaptée à l'isolement des SCMK-B et des SCMK-RG. Elle permet d'éluer quatre fractions parfaitement définies ; la première est constituée en majeure partie par les SCMK-B, la 3ème correspond aux SCMK-RG qui sont comparables à la seconde fraction caractérisée au cours de la filtration sur Sephadex G75 des SCMK ou des SCMK-A.

Les diagrammes d'élution sont identiques pour les protéines extraites soit de la laine vierge, soit des cellules corticales.

L'identité va d'ailleurs beaucoup plus loin ; en effet, dans le tableau XII, les compositions en amino-acides des différentes fractions protéiques isolées des cellules corticales et de la laine elle-même sont comparables, compte tenu des différences de méthodes d'analyse.

TABLEAU XII

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES FRACTIONS PROTEIQUES EXTRAITES
DE LA LAINE

(Nombre de résidus d'amino-acides pour cent amino-acides (*))

	Fraction pauvre en soufre		Fraction riche en glycocolle		Fraction	
	Laine vierge	cellules corticales	Laine vierge	Cellules corticales	pauvre en soufre	riche en soufre
	1	2	3	4	5	6
Alanine	6,6	8,1	1,6	1,9	6,9	2,8
Arginine	7,4	8,6	4,6	4,5	7,0	5,6
Ac.aspartique	8,7	9,8	2,5	4,6	9,5	2,8
SCM-cystine	5,7	5,4	6,4	6,3	5,3	17,8
Ac.glutamique	15,6	16,1	0,4	3,2	14,7	8,0
Glycocolle	7,2	7,5	34,3	29,3	7,1	6,5
Histidine	0,7	0,8	0,7	0,5	0,8	0,8
Isoleucine	3,7	-	-	-	3,9	3,4
Leucine	9,1	12,6	5,2	6,4	10,2	3,7
Lysine	3,2	2,8	traces	0,7	4,2	0,6
Méthionine	0,5	-	traces	-	-	-
Phénylalanine	2,6	2,3	6,7	7,0	2,9	1,8
Proline	3,9	4,2	3,3	4,9	3,6	13,5
Sérine	10,6	9,9	11,4	11,6	8,5	14,2
Thréonine	5,4	5,9	3,0	2,6	4,9	11,1
Tyrosine	3,6	traces (**)	18,2	11,8	3,7	2,0
Valine	5,6	6,0	1,7	2,4	5,7	5,4

(*) Ce mode d'expression permet la comparaison avec les résultats obtenus par la méthode des dinitrophénylamino-acides (colonnes 2 et 4).

(**) Il arrive fréquemment que par la méthode des dinitrophénylaminoacides la tyrosine soit fortement sous-estimée. L'indication (M et S) correspond aux dosages faits par la méthode de MOORE et STEIN, et (DNP) aux dosages par la technique des dinitrophénylaminoacides.

(***) Calculé d'après les résultats de CREWTER et DOWLING (69).

BUS
LILLE

Il convient toutefois de s'interroger sur la différence de composition de la fraction SCMK(PS- α 1) (Tableau V, colonne 4) obtenue par précipitation acétonique et de la fraction SCMK-A des cellules orthocorticales recueillie par gel-filtration. La première accuse des teneurs en glycoColle et en sérine supérieures à celles de la seconde et surtout, la proportion de glycoColle en position N-terminale est beaucoup plus importante. Il est possible que la précipitation acétonique ait enrichi cette préparation en un certain nombre de composants des SCMK-RG, de mobilité électrophorétique voisine de celle des SCMK-A et qui ont aussi le glycoColle comme groupement N-terminal prépondérant. La filtration sur gel de Sephadex permet d'éliminer ces SCMK-RG

Nous avons tenté d'expliquer la présence de nombreux groupements terminaux trouvés dans les SCMK-A, qui sont cependant homogènes en électrophorèse libre et en ultracentrifugation. En fait, ces fractions analysées récemment par électrophorèse en gel d'amidon, sont encore hétérogènes : la figure 18 donne les résultats obtenus sur des fractions extraites de la laine vierge. La fraction correspondant aux SCMK-A, préparée par précipitation isoélectrique et par gel-filtration, contient au moins quatre groupes de protéines en électrophorèse en gel d'amidon. Les résultats obtenus avec les protéines issues des cellules corticales sont très voisins.

V - CONCLUSIONS

Les résultats exposés dans ce chapitre montrent que les protéines extraites, soit des cellules corticales, soit de la laine vierge sont identiques. Certes, la présence d'une importante quantité de glycoColle en position N-terminale dans une préparation de SCMK-A (SCMK(PS- α 1)) laisse subsister un certain doute sur la possibilité d'un petit nombre de coupures des chaînes kératiniques au niveau du glycoColle, mais l'ensemble

des propriétés de ces deux types de protéines montre une très grande similitude, ce qui permet de considérer que l'hydrolyse pepsique est un excellent moyen de préparation des cellules orthocorticales. D'ailleurs, l'électrophorèse en gel d'amidon des SCMK isolées des cellules corticales obtenues par hydrolyse pepsique est tout à fait comparable à celle des SCMK extraites de la laine vierge (Figures 19 A et B). Il n'en est pas de même pour les SCMK isolées d'une laine traitée par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 15 minutes à 60°C. Ce traitement qui est utilisé pour l'obtention des cellules corticales suivant LEVEAU (70) modifie donc nettement les SCMK isolées (Figure 19 C).



FIGURE 19

Electrophorèse sur gel d'amidon de quelques SCMK

- A : SCMK (laine vierge)
- B : SCMK (orthocortex obtenu par hydrolyse pepsique de la laine)
- C : SCMK (laine traitée 15 minutes à 60°C par HCl 6 N)
- D : SCMK ("noyau" en hélice α obtenu par hydrolyse pepsique de 10 minutes des SCMK-A)

C H A P I T R E I V

SITES D'ACTION DE LA PEPSINE AU COURS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES KERATINES

I - INTRODUCTION

L'ensemble des travaux relatés précédemment nous montre d'une part que l'action de la pepsine sur la laine est limitée quantitativement, et d'autre part que les protéines isolées de la laine vierge ou des cellules corticales obtenues par hydrolyse pepsique ont des propriétés physicochimiques identiques.

Nous nous proposons maintenant de préciser quelle est la nature des régions de la fibre solubilisées par la pepsine et d'autre part quelle est la sélectivité réelle d'action de cet enzyme vis-à-vis des kératines.

Dans ce but nous avons étudié l'action de la pepsine :

- 1) sur les SCMK,
- 2) sur les kératines réduites et "repontées" artificiellement,
- 3) sur la laine vierge.

II - ACTION DE LA PEPSINE SUR LES SCMK (T 52 et 53).

A) HYDROLYSE PEPSIQUE DES SCMK-A(OC)

La solution protéique utilisée titre 32,8 μM d'azote protéique par ml et correspond à 22,9 μEq de norleucine par ml (détermination sur un hydrolysate chlorhydrique 6 N de 24 h.)(*)

(*) 1 ml de solution de SCMK est hydrolysé pendant 24 heures sous vide à 110°C par HCl 6 N. L'hydrolysate est traité comme pour une analyse d'acides-amino (T 10). Par réaction à la ninhydrine et en étalonnant la courbe de coloration à 573 $\text{m}\mu$ à l'aide d'une solution titrée de norleucine, on estime le nombre de NH_2 réagissant en équivalents de Norleucine.

L'hydrolyse est très rapide pendant la première demi-heure. Elle est pratiquement terminée au bout de trois heures et ne progresse plus que très lentement (Figure 20) pour atteindre à la 9ème heure un taux correspondant à l'apparition d'un nombre de NH_2 libres équivalant à 0,076 μEq de norleucine par μM d'azote protéique. Après 24 heures le taux ne s'est élevé qu'à 0,087 μEq soit dans le cas présent 2,85 $\mu\text{Eq/ml}$. Comparée au nombre de NH_2 libérés par hydrolyse totale chlorhydrique, cette valeur représente 12,5 % des NH_2 , le reste de l'azote étant encore engagé dans des liaisons peptidiques.

B) HYDROLYSE PEPSIQUE DES SCMK-B(OC)

La solution protéique utilisée titre 26,5 μM d'azote protéique par ml et correspond à 15 μEq de norleucine par ml (détermination sur un hydrolysats chlorhydrique 6 N de 24 h).

L'hydrolyse est pratiquement aussi rapide que celle des SCMK-A(OC) quoique la pente de la droite à l'origine soit plus faible (Figure 20). Toutefois, elle continue longtemps à progresser lentement et n'atteint pas un palier comme dans le cas de SCMK-A(OC). Après 23 heures d'hydrolyse, l'apparition des NH_2 libres correspond à 0,049 μEq de norleucine par μM d'azote protéique, soit 1,30 μEq de norleucine par ml de solution. Comparée au nombre des NH_2 libérés par hydrolyse chlorhydrique cette valeur représente 8,7 % des NH_2 , le reste des NH_2 est encore engagé dans des liaisons peptidiques.

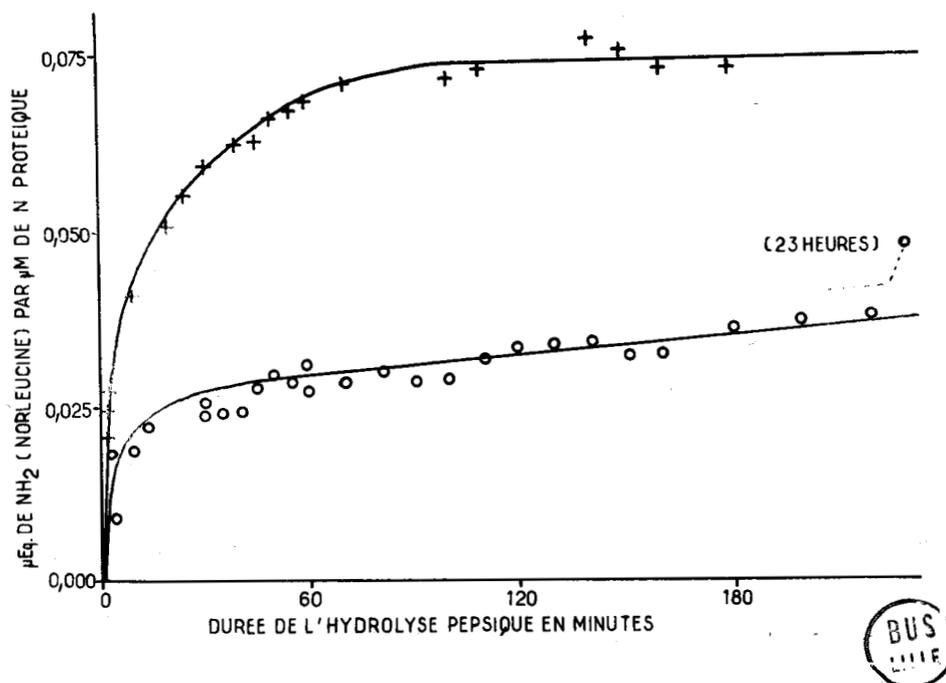


FIGURE 20

Cinétique de l'hydrolyse pepsique des SCM-K :

++++ : SCM-K-A
 oooo : SCM-K-B

C) ETUDE CHIMIQUE DES FRAGMENTS PROTEIQUES DES SCM-K-A
RESISTANTS A L'HYDROLYSE PEPSIQUE.

1°) Composition en amino-acides

Les fragments protéiques résistant à l'hydrolyse sont isolés par précipitation en milieu trichloracétique (T 54). Le fractionnement primaire des hydrolysats de SCM-K-A est illustré par le schéma du paragraphe 6. Les SCM-K-RG sont éliminées par gel-filtration sur Sephadex G75 (T 24).

La composition en amino-acides de ces fragments est très intéressante. Elle montre qu'après un temps très court d'hydrolyse (10 minutes), il ne reste plus qu'un noyau très riche en amino-acides dicarboxyliques (30 % de résidus) et en

amino-acides basiques (13 %). L'ensemble de la composition pour différents temps d'hydrolyse est résumé dans le tableau XIII.

2^o) Amino-acides en position N-terminale

Le tableau XIV montre que les acides aminés laissés en position N-terminale après dix minutes d'hydrolyse sont en majorité et presque exclusivement la phénylalanine et la tyrosine. Si au bout de 10 minutes d'hydrolyse on note une diminution du pourcentage des autres amino-acides en position N-terminale, celle-ci n'est que relative et due uniquement à la prépondérance des coupures au niveau de la tyrosine et de la phénylalanine.

III - ACTION DE LA PEPSINE SUR LES KERATINES REDUITES ET "REPONTEES".

Les kératines "repointées" (T 65) dérivées de la laine vierge, sont mises en suspension dans un tampon acétate de pH 1,8 et soumises à l'action de la pepsine selon le protocole habituel (5 à 7 jours à 40°C) (T 30).

Ces protéines passent très rapidement en solution. Cette solution légèrement trouble est centrifugée à 30.000 g pendant 15 minutes pour éliminer le trouble. Une dialyse complète à 4°C montre que 88 % environ des kératines sont transformées en peptides dialysables.

L'adialysable peut être fractionné par précipitation à l'acide acétique à pH 5,5, le précipité représente environ 9 % des protéines de départ.

Les compositions en amino-acides de ces différentes fractions ont été déterminées par la méthode des DNP (T 11), elles sont rassemblées dans le tableau XV.

La partie dialysable ne s'écarte pas sensiblement par sa composition de l'ensemble des protéines de départ. Il n'en est pas de même des fragments protéiques enzymatico-résistants.

TABLEAU XIII

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES SCMK-A HYDROLYSEES PAR LA
PEPSINE(Nombre de résidus d'amino-acides pour 100 amino-acides dosés
par la méthode de MOORE et STEIN)

	SCMK-A (*)	SCMK-A HYDROLYSE PEPSIQUE			SCMK-A Fraction en α-hélice (***)
		10 min. Précipité TCA(**)	10 min. Adialysable TCA (**)	30 min. Précipité TCA (**)	
Alanine	6,6	8,7	8,1	9,9	7,8
Arginine	7,4	8,0	5,3	5,1	7,3
Ac.aspartique	8,7	9,9	11,5	9,5	11,2
SMC-Cystéine	5,7	2,6	4,2	1,3	2,3
Ac.glutamique	15,6	<u>21,7</u>	21,0	<u>24,4</u>	<u>20,1</u>
Glycocolle	7,2	4,0	7,2	5,9	3,2
Histidine	0,7	0,9	0,6	0,3	0,8
Isoleucine	3,7	3,7	2,5	3,3	3,8
Leucine	9,1	<u>12,5</u>	8,9	<u>11,7</u>	<u>13,5</u>
Lysine	3,2	4,2	4,2	4,2	6,1
Méthionine	0,5	0,1	0,6	0,5	0,2
Phénylalanine	2,6	2,1	1,7	1,8	2,6
Proline	3,9	1,1	1,4	1,4	1,5
Sérine	10,6	7,5	9,2	7,6	7,0
Thréonine	5,4	5,1	5,9	5,6	3,7
Tyrosine	3,6	2,9	1,7	1,7	3,5
Valine	5,6	4,7	6,1	5,4	5,4

(*) Voir tableau XI. Les résultats du présent tableau sont relatifs à des hydrolysats chlorhydriques de 24 heures analysés suivant la méthode de MOORE et STEIN.

(**) Les précipités trichloracétiques (TCA) ont été soumis à la gel-filtration sur Sephadex G75. Seule l'analyse de la fraction de plus haut poids moléculaire figure sur ce tableau. La fraction adialysable (TCA) correspond aux peptides solubles en milieu trichloracétique et séparés par dialyse des peptides dialysables.

(***) Calculé d'après les résultats de CREWETHER et al. (71). Voir le texte. Cette fraction a été obtenue par hydrolyse pronasique de la laine.

TABLEAU XIV

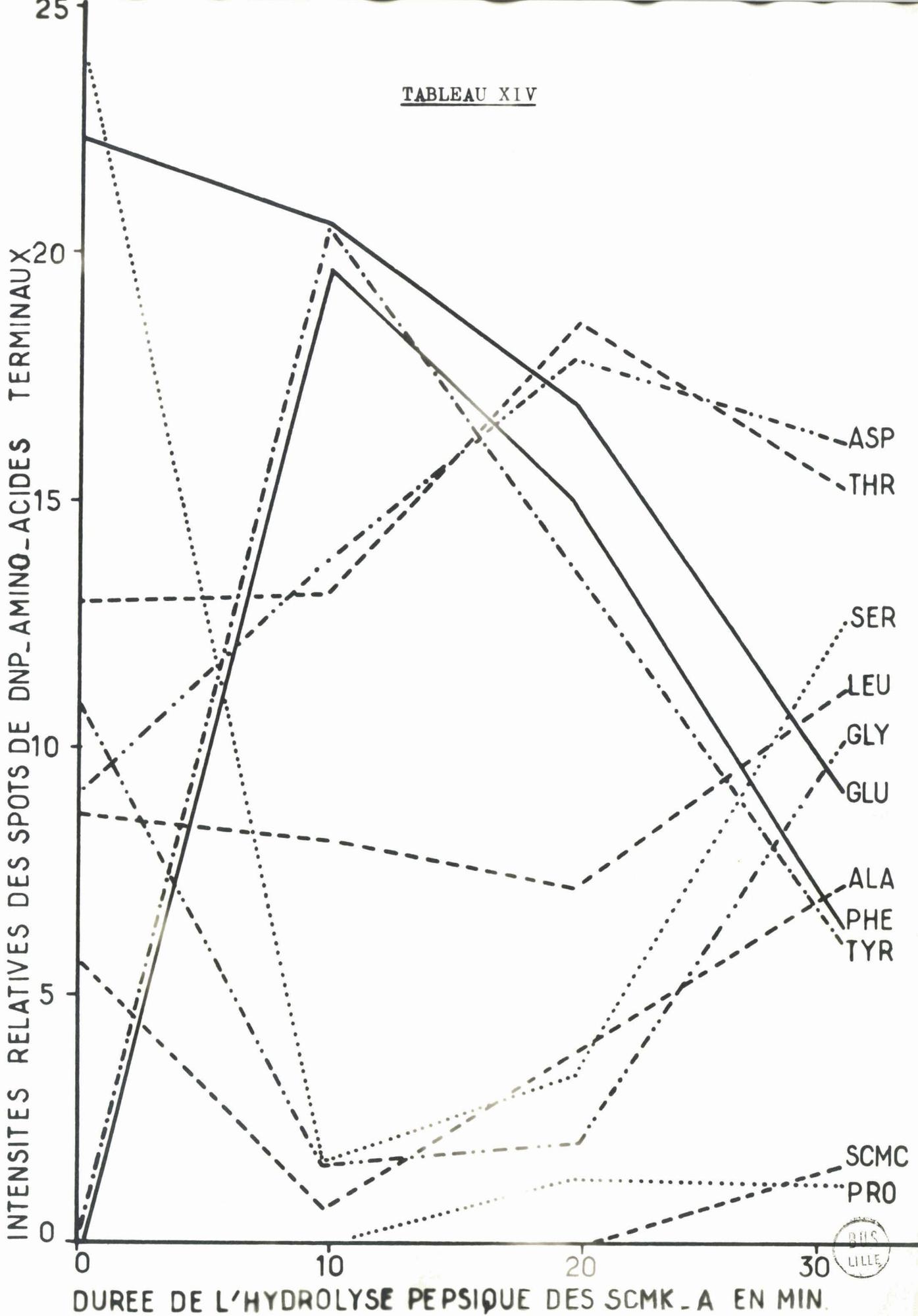


TABLEAU XV
COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES FRACTIONS ISOLEES A PARTIR D'UN HYDROLYSAT
PEPSIQUE DE KERATINES REDUITES SOUMISES A UNE OXYDATION DOUCE
 (Nombre de résidus d'amino-acides pour cent amino-acides dosés)

	ADIALYSABLE		DIALYSABLE	Bilan du nombre de résidus d'amino-acides dosés dans I + II + III	Kératines réduites et réoxydées avant hydrolyse pepsique
	Fraction précipitée à pH 5,5 % pondéral = 8,85	Surageant à pH 5,5 % pondéral = 3,35	Dialyse à pH 7 % pondéral = 87,80		
	I	II	III	IV	V
Alanine	4,0	6,1	7,9	7,5	6,0
Arginine	6,6	5,5	6,0	6,0	5,5
Ac. aspartique	1,9	6,9	8,6	7,9	7,2
Ac. cystéique	0,4	0,7	0,4	0,4	0,4
Cystine	13,2	7,0	3,2	4,2	4,8
Ac. glutamique	10,3	9,5	12,4	12,1	12,2
Glycocolle	7,0	11,8	10,6	10,3	11,1
Histidine	0,6	1,0	1,1	1,2	1,0
Leucines	4,9	7,0	12,3	11,5	11,6
Lysine	0,3	1,6	2,5	2,3	2,7
Phénylalanine	1,2	3,8	3,9	3,6	3,1
Proline	16,6	12,3	4,7	6,0	7,7
Sérine	12,8	13,7	10,8	11,1	10,2
Thréonine	12,2	7,9	5,5	6,2	6,7
Tyrosine	0,7	1,2	5,0	4,5	3,8
Valine	5,0	3,8	3,6	3,7	6,1
X	2,2	2,2	1,3	1,4	0,0

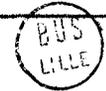
Dans le cas de la fraction précipitée à pH 5,5 en particulier, on note une très forte teneur en cystine et en proline. On note de même une augmentation très nette de la teneur en thréonine et également aussi de celle de la sérine. Or, on sait que les fractions résistantes à l'hydrolyse acide sont aussi très riches en cystine et en proline (PIGACHE) (72). Il nous a semblé intéressant de comparer la composition en amino-acides de ces deux noyaux résistants l'un à l'action de la pepsine et l'autre à l'hydrolyse sulfurique ménagée (H_2SO_4 N/10) (T 62). Ces noyaux ont une composition tout à fait comparable tant par leur richesse en proline et en cystine que par leur pauvreté en acide aspartique (Tableau XVI).

Le noyau enzymatico-résistant reconstruit donc au moins partiellement un édifice protéique complexe présentant les mêmes caractéristiques physicochimiques que les résidus de laine ayant été soumise à l'action des agents d'hydrolyse acide. Il est pourtant évident que lors du repontage des kératines réduites la structure tertiaire du réseau kératinique obtenu ne ressemble que très partiellement à celle de la laine vierge. En effet, le taux de "repontage" des kératines réduites et "repontées" artificiellement, calculé sur la base du rapport $\frac{\text{cystine}}{\text{cystine} + \text{cystéine}}$ est voisin de 50 %. Ce rapport est obtenu par dosage spectrophotométrique des dérivés dinitrophénylés sous azote et il est vraisemblable qu'il augmente au cours de l'hydrolyse pepsique et des manipulations successives. Quoiqu'il en soit, il demeure toujours important. Il semblerait donc que conformément aux remarques de ELÖD et ZANN (73) relatives à l'hydrolyse enzymatique de la laine, la présence des liaisons disulfure ne soit pas la cause essentielle de la limitation de l'action de l'enzyme. Ces auteurs indiquent en effet que le véritable empêchement à l'action de l'enzyme est la cristallinité due à l'orientation des molécules de kératines. En effet,

TABLEAU XVI

Comparaison des compositions en amino-acides de l'hydrolysats pepsique des kératines réoxydées (adiaclysable précipité à pH 5,5) de la laine vierge et des résidus d'hydrolysats sulfuriques de la laine et de ses fractions morphologiques (nombre de résidus d'acides aminés pour cent amino-acides dosés par la méthode des dinitrophénylamino-acides)

	NOYEAUX ACIDO-RESISTANTS				
	NOYAU ENZYMA-TICO-RESISTANT	II Résidu de laine vierge traitée 50h à l'ébullition par H ₂ SO ₄ N/10	III Résidu d'orthocortex (fraction OC) traité 40h. à l'ébullition par H ₂ SO ₄ N/10	IV Résidu de paracortex (fraction PC) traité 40h. à l'ébullition par H ₂ SO ₄ N/10	V Laine vierge
Alanine	4,0	6,4	6,2	5,2	5,7
Arginine	6,6	8,5	5,1	3,1	7,2
Ac. aspartique	1,9	1,1	2,6	2,7	6,5
Ac. cystéique	0,4	1,0	traces	0,4	-
Cystine	13,2	11,6	11,4	12,3	5,8
Ac. glutamique	10,3	10,4	14,0	13,5	12,4
Glycocolle	7,0	3,6	5,0	4,0	9,1
Histidine	0,6	1,1	0,2	0,7	0,8
Leucine	4,9	6,6	9,1	8,1	11,4
Lysine	0,3	1,6	2,2	1,8	1,8
Phénylalanine	1,2	0,7	0,6	1,0	2,9
Proline	16,6	16,4	15,2	16,4	7,3
Sérine	12,8	14,0	13,3	12,9	10,8
Thréonine	12,2	8,9	8,7	11,5	6,8
Tyrosine	0,7	0,7	traces	1,0	4,2
Valine	5,0	7,5	6,4	5,4	5,9



En effet, dès que cette orientation est détruite la laine est hydrolysée par les enzymes.

Cependant, il semble bien que la richesse en liaisons disulfure du "noyau" enzymatico-résistant soit la cause principale de sa résistance. En effet, sa teneur élevée en cystine et en proline semble incompatible avec une structure hélicoïdale qui dans les kératines est à la base de l'orientation des molécules. Aussi, nous a-t-il semblé intéressant de rechercher quelle était la disposition structurale des liaisons disulfure dans le "noyau". Est-il constitué par des protéines de haut poids moléculaire ou par un ensemble de peptides liés entre eux par des liaisons disulfure ?

Pour répondre à cette question, nous avons soumis ces protéines à la gel-filtration sur Sephadex G75 en milieu urée et à pH 8 (Figure 21 A). On distingue deux pics d'éluion : le premier correspondant au volume mort de la colonne donc à un ensemble protéique de dimensions assez importantes, l'autre est très étalé et correspond à des fragments beaucoup plus petits.

Le problème précédent se repose donc à nouveau pour les protéines de la fraction I. Par oxydation performique les liaisons disulfure sont coupées et la cystine est transformée en acide cystéique (T 59). Une filtration sur gel de Sephadex G75 permet encore d'éliminer une quantité importante de fragments de petites dimensions (Figure 21B).

La nouvelle fraction I est à nouveau réoxydée et resoumise à la gel-filtration. Après ce nouveau cycle il n'y a pratiquement plus d'élimination de petits peptides.

L'analyse en amino-acides de cette fraction montre une très grande richesse en acide cystéique et une teneur élevée en proline et en sérine (Tableau XVII).

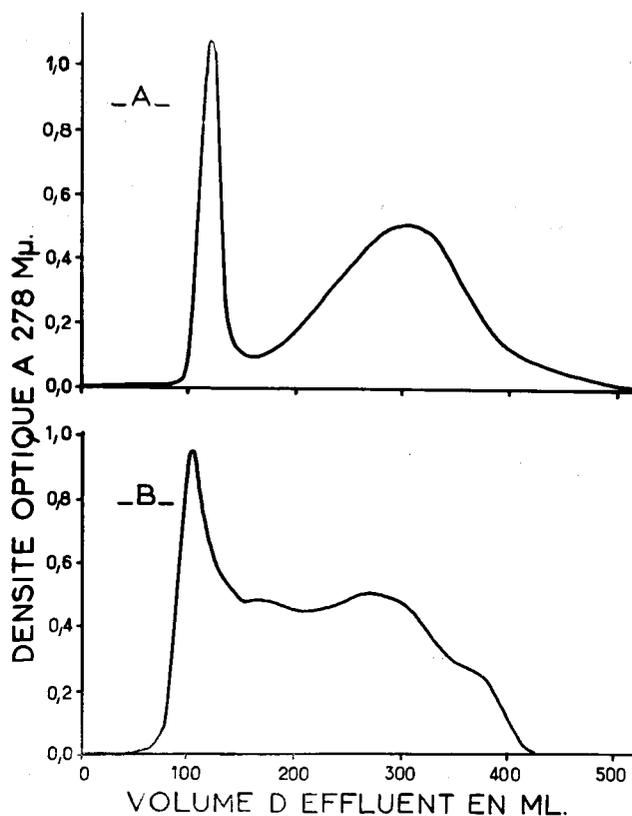


FIGURE 21

Chromatographie sur Sephadex G75 des kératines repontées artificiellement.

A - Chromatographie après repontage

B - Chromatographie des protéines du premier pic de la Figure 21.A, après coupure des ponts disulfure par oxydation performique.

TABLEAU XVIICOMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE QUELQUES FRACTIONS RICHESEN SOUFRE

(Nombre de résidus d'acides-amino pour 100 acides-amino dosés par la méthode de MOORE et STEIN).

	Kératines réoxydées Résidu riche en soufre (*)	SCMK-B(OC) (**)	SCMK-B 1 (***)	SCMK-B 2 (***)
Alanine	4,5	3,2	3,0	3,5
Arginine	6,4	6,5	5,1	3,2
Ac.aspartique	4,6	2,6	0,8	1,1
Ac.cystéique	<u>19,3</u>	0,1	-	-
Cystine	-	0,8	-	-
SCM-Cystéine	néant	<u>17,4</u>	<u>23,7</u>	<u>22,3</u>
Ac.glutamique	10,8	9,0	9,8	11,6
Glycocolle	7,4	5,9	6,3	9,0
Histidine	0,4	0,6	0,6	traces
Isoleucine	3,1	-	2,7	4,2
Leucine	4,0	6,6	1,8	1,9
Lysine	0,9	0,2	0,5	traces
Phénylalanine	1,9	1,7	0,7	1,3
Proline	<u>9,1</u>	<u>14,5</u>	<u>12,4</u>	<u>11,0</u>
Sérine	<u>14,5</u>	12,5	<u>14,8</u>	<u>14,2</u>
Thréonine	9,0	10,7	11,4	10,7
Tyrosine	-	traces	2,1	1,9
Valine	4,0	5,5	4,2	4,1

(*) Pour les explications sur l'origine de cette fraction, voir le texte paragraphe 3. Dosage sur un hydrolysate de 24 h selon MOORE et STEIN.

(**) Voir tableau IX colonne 3.

(***) Composition calculée d'après les résultats de GILLESPIE (74). Ces protéines correspondent à un fractionnement des SCMK-B dérivés de la laine vierge.

BUS
LILLE

IV - ACTION DE LA PEPSINE SUR LA LAINE VIERGE

La partie non attaquée par la pepsine constitue les cellules corticales et a fait l'objet du chapitre précédent. Dans ce paragraphe, nous n'étudierons donc que les fractions solubilisées au cours de l'hydrolyse.

Cette étude se limite à la comparaison de la composition en amino-acides des hydrolysats pepsiques (T 63) de laine Mérinos à différents temps d'hydrolyse. Les résultats obtenus par la méthode de MOORE et STEIN sont rassemblés dans le tableau XVIII. Ils sont exprimés en micromoles d'acides aminés pour permettre une interprétation quantitative. On peut en déduire quelques précisions sur la nature des fractions solubilisées.

Entre la 24ème heure et le 10ème jour d'hydrolyse, les peptides solubles libérés par hydrolyse pepsique, représentent une quantité globale d'amino-acides approximativement double de celle contenue dans les peptides libérés pendant les 24 premières heures (Colonnes 1, 2 et 3 du tableau XVIII). Cette proportion est sensiblement la même pour chacun des amino-acides pris séparément, sauf en ce qui concerne la cystine, amino-acide pour lequel elle est un peu plus élevée.

Cependant, il ne faut pas perdre de vue que quantitativement les teneurs en cystine, proline et arginine de l'hydrolysats pepsique de 10 jours sont beaucoup plus faibles que celles des autres acides aminés (colonne 5 du tableau XVIII).

TABLEAU XVIII

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES SOLUBLES DES
HYDROLYSATS PEPSIQUES DE LAINE MERINOS(Résultats exprimés en micromoles d'acides aminés solubilisés
par g de laine traitée (*)).

	Teneur en acides aminés des hydrolysats			Laine vierge (**)	% d'acides aminés conte- nus dans les peptides li- bérés en 240 h
	12 h	24 h	240 h		
Alanine	36,6	46,7	88,1	417	21,1
Arginine	21,0	25,6	49,7	602	<u>8,2</u>
Ac.aspartique	46,0	55,8	104,6	503	20,8
1/2 cystine	12,4	18,2	61,7	943	<u>6,5</u>
Ac.glutamique	56,0	78,3	157,4	1020	15,4
Glycocolle	40,7	65,6	127,4	688	18,5
Histidine	6,5	9,8	15,4	58	26,6
Isoleucine	18,9	18,1	35,1	234	15,0
Leucine	40,7	53,1	108,2	583	18,5
Lysine	21,8	39,4	55,1	193	28,5
Méthionine	7,3	6,0	14,3	37	38,6
Phénylalanine	15,8	20,5	38,0	208	18,3
Proline	15,4	23,3	46,1	633	<u>7,3</u>
Sérine	40,9	59,9	112,5	860	13,1
Thréonine	17,4	38,7	69,2	547	12,7
Tyrosine	18,9	24,2	52,6	353	14,9
Valine	27,0	35,0	73,1	423	17,3

(*) Temps d'hydrolyse chlorhydrique 24 h. Les résultats sont corrigés pour tenir compte de la présence de pepsine dans les hydrolysats et sont obtenus par la méthode de MOORE et STEIN.

(**) D'après SIMONDS (75).

V - DISCUSSION

1^o) La comparaison des courbes de cinétique d'hydrolyse pepsique des SCM-K-A et des SCM-K-B montre que l'hydrolyse des protéines pauvres en soufre (SCMK-A) est plus rapide que celle des protéines riches en soufre (SCMK-B). Ce résultat est en contradiction complète avec ceux de SPRINGELL (76). Cet auteur trouve une cinétique d'hydrolyse plus rapide pour les SCM-K-B que pour les SCM-K-A. L'explication de cette contradiction réside sans doute dans la façon d'apprécier le taux d'extension de l'hydrolyse. En effet, SPRINGELL apprécie le taux d'azote du surnageant trichloracétique des produits d'hydrolyse et ce procédé totalement différent du nôtre est critiquable.

Quoiqu'il en soit, l'hydrolyse pepsique est très rapide dans les deux cas et ne semble pas limitée comme c'est le cas pour la laine native (voir chapitre I). On coupe cependant relativement plus de liaisons peptidiques dans les SCM-K-B.

2^o) La fraction enzymatico-résistante des SCM-K-A est précipitable en milieu trichloracétique. Sa composition est très différente des SCM-K-A d'origine.

Elle contient moins de proline, de SCM-cystéine, de glycine et de sérine que les SCM-K-A et les taux d'acide glutamique et de leucines sont nettement augmentés (Tableau XIII). La composition de cette fraction est tout à fait analogue au noyau qui persiste après l'action de la "pronase" et qui a été décrit récemment par CREWITHER et al. (77), (Tableau XIII, colonne 5). Ces auteurs montrent qu'il est principalement constitué de fragments à structure α -hélicoïdale ; ce noyau en α -hélice prendrait naissance après coupures de certaines liaisons peptidiques par l'enzyme dans les régions de transition des SCM-K-A non hélicoïdales. En réalité, si cette conception est valable il ne faut pas négliger non plus que des coupures importantes peuvent être faites en des temps très courts d'hydrolyse

au niveau des liaisons peptidiques qui sont les plus sensibles à l'action de la pepsine.

L'étude des groupes terminaux libres de ce "noyau" en α -hélice est particulièrement révélatrice à ce sujet (Tableau XIV). Après 10 minutes d'hydrolyse, les amino-acides en position N-terminale sont en majorité et presque exclusivement la phénylalanine et la tyrosine. Il s'avère donc que pour des temps relativement courts d'hydrolyse la pepsine agit d'une façon très spécifique et classique. Cette action de la pepsine sur les kératines est tout à fait comparable à celle de cet enzyme sur la chaîne β de l'hémoglobine humaine (KONIGSBERG et coll.) (78). Dans ces conditions, il est difficile d'invoquer exclusivement l'affinité de l'enzyme pour des régions de transition dans la structure, comme le font CREWSTER et al. (79).

Pour des temps d'action plus prolongés, les coupures deviennent moins spécifiques. Au bout de 20 minutes, on peut encore déceler des coupures préférentielles au niveau des résidus d'acide aspartique et de thréonine. Les coupures non spécifiques qui sont ensuite les plus rapides semblent se faire au niveau des résidus de sérine et de glycolle qui sont vraisemblablement situés dans ces régions de rupture de la structure en α -hélice. En effet, le glycolle (BAMFORD et al. (80) et la sérine (BOHAK et KATCZALSKI) (81) ne favorisent pas la structure en α -hélice des chaînes peptidiques.

Les propriétés physicochimiques de ce noyau à structure en α -hélice sont aussi très intéressantes. Tout d'abord, même en milieu urée, il forme un système protéique très agrégé. Ceci est vraisemblablement explicable, en plus de la configuration hélicoïdale, par la présence d'un grand nombre de groupements carboxyliques et basiques. Il se forme sans doute de nombreuses "liaisons salines" entre les groupements carboxyliques libres des amino-acides dicarboxyliques et les groupements aminés des

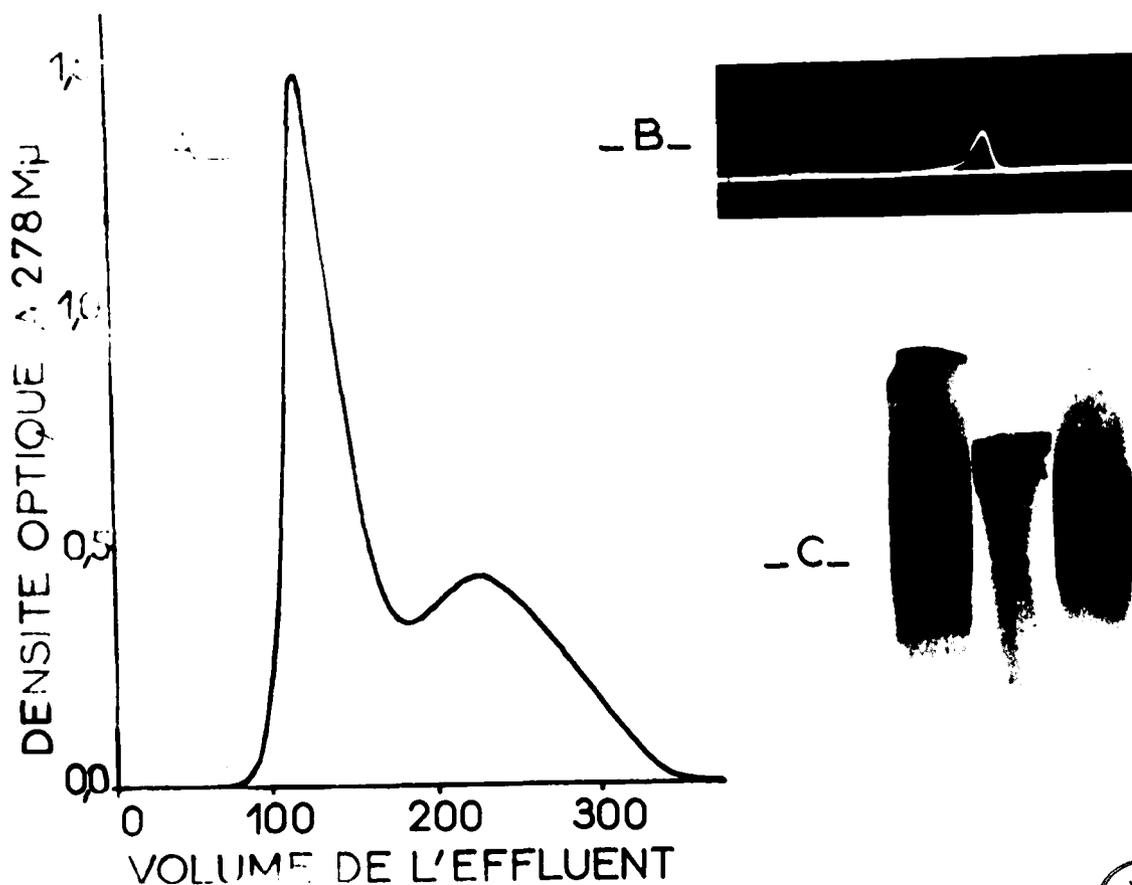
amino-acides basiques. Les forces d'agrégation sont si fortes que, même en électrophorèse libre à pH 11, on révèle un pic qui conserve encore une certaine homogénéité (Figure 22 B).

L'étude des diagrammes d'élution sur Sephadex G75 (Figure 22 A) en milieu urée 8 M montre que, même après un temps d'hydrolyse pepsique de 30 minutes, le résidu protéique précipitable et débarrassé des kératines riches en glycolle, se comporte encore comme un composé de poids moléculaire relativement élevé. Certes le pic d'élution n'est plus symétrique, mais il conserve un certain degré d'homogénéité.

L'homogénéité relative de ce "noyau" en α -hélice n'est en réalité qu'apparente. En effet, l'électrophorèse sur gel d'amidon en présence d'urée 8 M (T 17) montre un diagramme totalement différent de celui des SCM-K-A. Les bandes caractéristiques de cette fraction sont remplacées par de nombreuses bandes plus rapides (Figures 21 C et 19 D).

Cette résolution supérieure à celle de l'électrophorèse libre s'explique par le fait qu'en plus de l'électrophorèse, le gel d'amidon introduit un phénomène de gel-filtration poussée qui est insuffisante pour dissocier cet agrégat peptidique. Cette influence de la gel-filtration peut être très facilement vérifiée : ainsi, l'emploi de gels de Sephadex très réticulés tel que le Sephadex G200 en milieu urée 8 M permet un fractionnement là où le Sephadex G75 ne révélait qu'une asymétrie du pic d'élution.

L'abaissement des teneurs en sérine, en glycolle, en cystine et en proline du "noyau" en α -hélice (Tableau XIII) nous permet de nous demander sous quelle forme ces amino-acides sont éliminés de la structure des SCM-K-A au cours de l'hydrolyse pepsique. S'agit-il de peptides adialysables ou de petits fragments (peptides dialysables ou amino-acides libres.) ?



BUS
LILLE

FIGURE 22

Etude du résidu d'hydrolyse pepsique des SCMK-A
("noyau" en hélice α)

- A : Première chromatographie sur Sephadex G75
- B : Electrophorèse libre à pH 10,5
- C : Electrophorèse sur gel d'amidon

De la gauche vers la droite :

- 1^o) Fraction précipitable en milieu trichloracétique
- 2^o) Fraction soluble en milieu trichloracétique (adialysable)
- 3^o) "Noyau" en hélice α obtenu par chromatographie du précipité TCA, sur Sephadex G200

L'étude de la fraction de l'hydrolysate pepsique soluble en milieu trichloracétique et adialysable montre que sa composition en amino-acides n'est pas très différente de celle du noyau en α -hélice obtenu après dix minutes d'hydrolyse. Sa teneur en acides aminés basiques est toutefois moins élevée (Tableau XIII), ce qui explique sa mobilité électrophorétique plus grande et voisine de celle des SCM-K-B (Figure 22 C).

En conséquence, le glyco-colle, la sérine et surtout la SCM-cystéine et la proline se trouvent rapidement éliminées comme amino-acides constitutifs de peptides dialysables. Le résultat est en faveur de nombreuses coupures de liaisons peptidiques dans les zones à structure au hasard, puisque la cystine (BLOUT et al.) (82) et la proline (KURTZ et al.) (83) comme le glyco-colle et la sérine ne favorisent pas la conformation hélicoïdale des chaînes peptidiques. Il s'ensuit donc qu'il existe dans les chaînes α -kératiniques des régions riches en glyco-colle, sérine, cystine et proline qui sont préférentiellement hydrolysées en plus des liaisons peptidiques des SCM-K-A spécifiquement hydrolysées par la pepsine.

3^o) Les kératines réduites et carboxyméthylées (SCMK) sont profondément et complètement attaquées par la pepsine ; l'hydrolyse des kératines "repointées" quoique importante, semble différente à cause de la présence de liaisons disulfure. Elle laisse en effet subsister un noyau enzymatico-résistant très riche en cystine et en proline. Cette richesse en ces amino-acides, accompagnée d'une teneur assez élevée en sérine montre que ce noyau a les caractères principaux de la fraction "riche en soufre" définie dans la littérature (colonnes 3 et 4 du tableau XVII). Ce noyau après oxydation performique et fractionnement sur Sephadex G75 laisse subsister une faible quantité d'une fraction de haut poids moléculaire et de composition identique

aux SCMK-B (colonne 1 du tableau XVII).

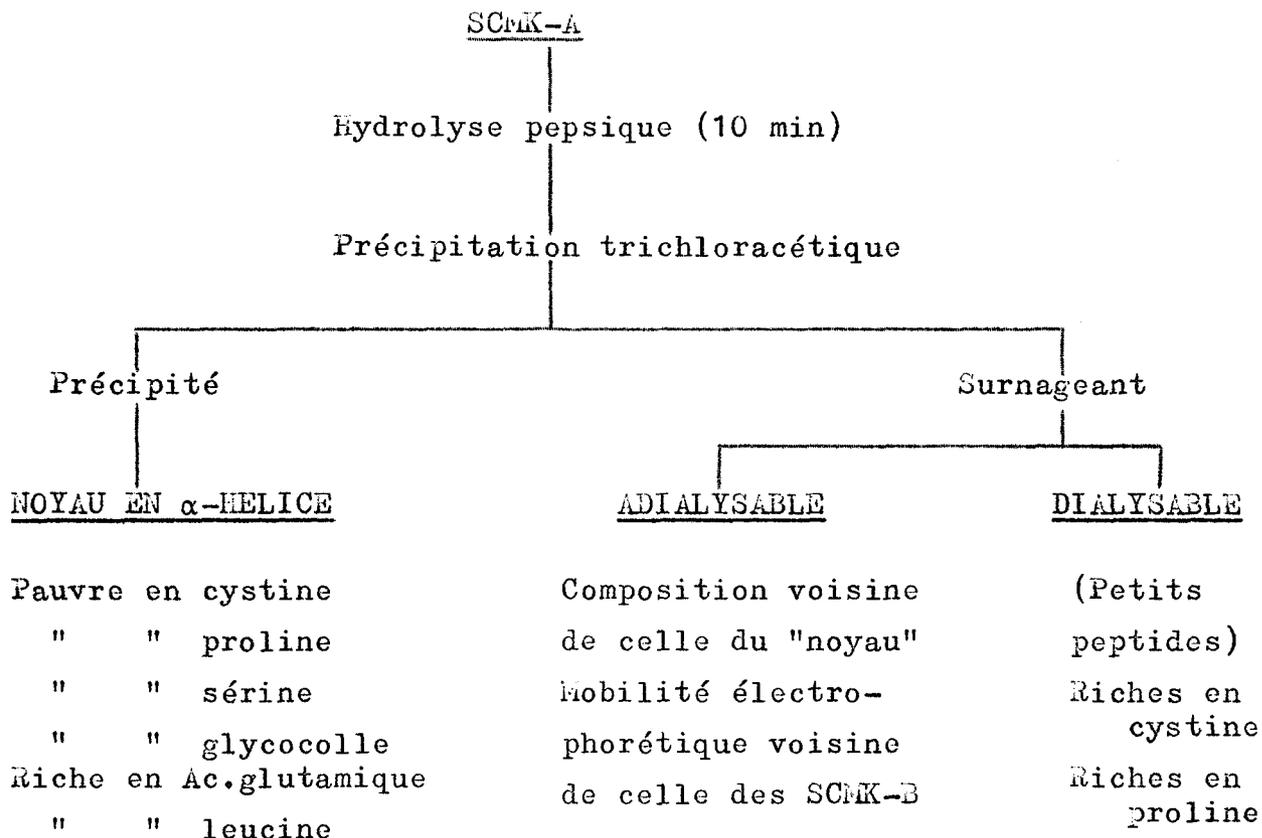
Si l'importance quantitative de ce résidu est faible, sa mise en évidence est extrêmement intéressante : elle permet d'imaginer une structure générale du noyau riche en soufre. Ce dernier est constitué d'un squelette riche en soufre de poids moléculaire relativement important, sur ce squelette sont branchées de nombreuses chaînes plus courtes liées par des ponts disulfure, d'une part à la chaîne principale, d'autre part entre elles. Le tout forme un ensemble compact et parfaitement résistant à l'hydrolyse enzymatique.

4^e) Les kératines repontées artificiellement ne reconstituent que partiellement la structure tertiaire telle qu'elle existe dans la laine vierge et ceci explique que l'attaque pepsique est importante et ne laisse subsister qu'un noyau riche en soufre résistant à l'action de l'enzyme. Il n'en va pas de même au cours de l'hydrolyse pepsique de la laine. L'étude des hydrolysats pepsiques de laine vierge à différents temps d'hydrolyse (Tableau XVII) permet d'affirmer que tout au long de l'hydrolyse, les rapports molaires des différents amino-acides constitutifs des peptides solubilisés, à l'exception de la cystine, sont sensiblement constants. Dans le cas de la laine Mérinos, la solubilisation de la cystine quoique toujours très faible subit une légère augmentation au bout de quelques jours d'hydrolyse. Ce processus peut s'expliquer par le fait que la pepsine hydrolyse en premier lieu la zone orthocorticale de la fibre et seulement après la zone paracorticale. Ce fait semble confirmé par l'hydrolyse pepsique du mohair (à prédominance orthocorticale) au cours de laquelle on ne solubilise constamment que des peptides dont la teneur en cystine est très faible ou presque nulle. On peut donc parler d'une certaine spécificité de la pepsine en ce sens qu'elle attaque constamment des régions pauvres en cystine et dont la composition chimique rappelle

celle des SCMK-A, à l'exception d'une teneur en cystine plus faible. Ces faits nous ont conduit à émettre l'hypothèse de l'action de la pepsine sur les substances non kératiniques en général et sur les ciments intercellulaires en particulier puisque ceux-ci disparaissent au cours de l'hydrolyse (MOSCHETTO et BISEPTE) (84). Pour expliquer la présence de nombreux groupements terminaux dans les SCMK(OC) nous avons même évoqué, parmi un certain nombre d'hypothèses à vérifier, la possibilité de coupures dans la région des protéines pauvres en soufre (dont dérivent les SCMK-A) n'ayant pas la configuration en α -hélice (MOSCHETTO et BISEPTE) (85). Les régions de transition entre la structure hélicoïdale α et les régions de disposition au hasard sont en effet particulièrement accessibles (LINDERSTROM-LANG) (86), (MILLER) (87). En résumé nous ne prétendons pas que la pepsine attaque exclusivement les ciments intercellulaires en tant qu'entité morphologique, mais qu'elle attaque exclusivement des régions pauvres en soufre et bien délimitées, dont font partie les ciments intercellulaires.

VI - CONCLUSION

La pepsine hydrolyse très rapidement les SCMK. L'hydrolyse pepsique des SCMK-A permet d'isoler un noyau analogue à celui obtenu par hydrolyse pronasique par CREWTER et al. (88). Le fractionnement primaire de l'hydrolysate pepsique (10 min.) des SCMK-A et les propriétés essentielles des fractions isolées sont illustrés par le schéma suivant :



Les coupures se font d'abord au niveau des acides aminés aromatiques tout en libérant des fragments de chaînes peptidiques riches en glycocolle, sérine, proline et cystine, dont la structure est non hélicoïdale.

Il s'ensuit donc qu'il faut admettre que, même dans les α -kératines, la structure en α -hélice n'est pas continue. Ce fait confirme le schéma que nous avons proposé antérieurement (MOSCHETTO et BISERTE) (89).

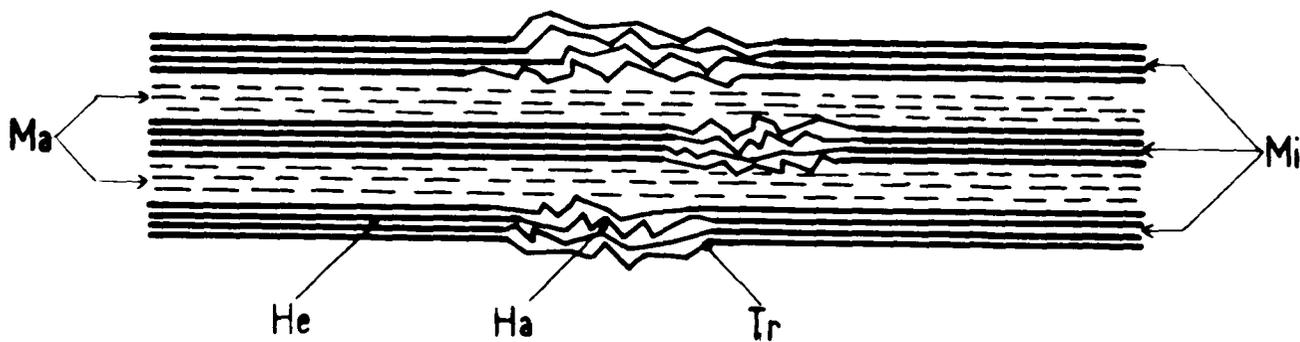


FIGURE 23

Schéma structural des kératines de la laine.

- (Mi) Protéines des microfibrilles pauvres en soufre.
- (Ma) Protéines de la matrice riche en soufre
- (He) Région de structure en α -hélice.
- (Ha) Région de structure en disposition au hasard.
- (Tr) Région de transition des structures (He) et (Ha) : zone probable de coupures par les réactifs chimiques.

L'action de la pepsine sur les kératines "repointées" artificiellement montre d'une part, que si l'attaque est très étendue, il est possible d'obtenir un noyau très riche en cystine et proline de composition analogue aux SCM-K-B et de poids moléculaire assez important. La résistance à l'hydrolyse est vraisemblablement due à sa haute teneur en cystine qui fait qu'il se trouve entouré par des chaînes plus petites liées par des ponts disulfure. Ces ponts rompus par oxydation libèrent la chaîne principale que l'on peut isoler par gel-filtration.

L'attaque pepsique de la laine vierge se fait dans des zones à faible teneur en soufre et les régions hydrolysées ont une composition voisine des SCM-K-A, sauf en ce qui concerne leur teneur en cystine qui est plus faible.

C H A P I T R E V

ETUDE GENERALE DES PROTEINES CONSTITUTIVES DES KERATINES ISOLEES A L'ETAT DE S-CARBOXYMETHYLKERATINES

I - INTRODUCTION

Les résultats analytiques exposés au Chapitre III montrent une grande similitude entre les protéines extraites de l'orthocortex et celles issues de la laine vierge. Il est donc raisonnable de conclure que les protéines extraites de la laine vierge par le thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 11 et à 0°C proviennent en majeure partie de régions à caractère orthocortical, même dans la zone de la fibre histologiquement et globalement définie comme du paracortex. Cette constatation jointe à un certain doute sur la possibilité de coupures de quelques liaisons peptidiques dans les chaînes protéiques des cellules orthocorticales isolées par hydrolyse pepsique, nous a conduit à utiliser des préparations directement extraites de la laine vierge, pour aborder des études détaillées de constitution.

L'hétérogénéité chimique des deux classes majeures des kératines de la laine est bien connue. THOMPSON et O'DONNELL (90) ont montré celle des SCM-K-A et GILLESPIE (91) celle des SCM-K-B. La chromatographie sur Sephadex G75 nous a permis d'isoler les SCM-K(RG), une des classes mineures contaminant les SCM-K-A (MOSCHETTO et BISERTE) (92). Le présent chapitre décrit les recherches que nous avons faites, en ce qui concerne l'hétérogénéité des SCM-K, leur classification et les possibilités d'isolement de protéines hautement purifiées.

II - CONDITIONS D'EXTRACTION DES KERATINES

Les différentes méthodes d'extraction des kératines par

action du thioglycolate de potassium sur la laine sont toutes dérivées de la méthode originale de GODDARD et MICHAELIS (93). Dans toutes les méthodes utilisées le choix des conditions d'extraction a été guidé par deux facteurs essentiels

- 1) Extraire le maximum de protéines
- 2) Procéder à des extractions aussi sélectives que possible.

C'est dans cette ligne que s'inscrivent les travaux de GILLESPIE et LENNOX (94) et GILLESPIE (95). Ces auteurs procèdent à 5 extractions de 20 minutes par le thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 10,5.

Les différents extraits contiennent des mélanges protéiques de composition sensiblement différente (SIMMONDS et STELL) (96). Une nouvelle extraction à pH 12,3 permet d'extraire une quantité supplémentaire de protéines, qui, par relargage à l'acétate de zinc, conduit à une fraction pauvre en soufre dénommée par les auteurs SCMK-A2.

D'autres techniques ont été décrites pour extraire plus sélectivement les protéines riches en soufre (SCMK-B). A cet effet GILLESPIE (97) traite la laine 2 heures à 40° avec le thioglycolate de potassium 0,8 M à pH 10,2.

Nous nous sommes proposés de voir quelle pouvait être l'influence de la température sur l'extraction des kératines de la laine par le thioglycolate de potassium et de déterminer quels étaient exactement les composants extraits à chaque température utilisée. Cette série de recherches est essentielle car l'étude ultérieure de la structure des SCMK nécessite des conditions d'extraction aussi douces que possible.

Les taux d'extraction en fonction des différentes techniques utilisées sont rassemblés dans le tableau XIX et les compositions en amino-acides des fractions extraites sont données dans le tableau XX.

TABLEAU XIXTAUX D'EXTRACTION DE LA LAINE PAR LE THIOGLYCOLATE
DE POTASSIUM 0,1 M A pH 11 A DIFFERENTES TEMPERATURES.

Conditions d'extraction	Traitement initial 16 h à 0°C (SCLK(LV))	Traitement supplémentaire 2 h à 50°C (SCLK(LV)II)	Traitement supplémentaire 2 h à 50°C milieu urée 3 M (SCLK(LV)III)
Taux d'extraction atteint au stade final	35 - 36 %	58 %	70 - 75 %
Pourcentage de la fraction pauvre en soufre	54 %	95 %	100 %
Pourcentage de la fraction riche en soufre	46 %	5 %	0 %

TABIEAU XX
COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES SCMK EXTRAITES DE LA LAINE
A DIVERSES TEMPERATURES

(nombre de résidus d'amino-acides pour 100 acides aminés)

	1ère extraction (16 h à 0°C, pH 11)		2ème extraction (2 h à 50°C, pH 11)			3ème extraction (2 h à 50°C, pH 11 urée 8 M 6 SCMK-A
	1 SCMK-A	2 SCMK-B	3 SCMK-A	4 SCMK-B	5 SCMK-RG	
Alanine	6,4	3,7	8,4	3,5	4,4	7,0
Arginine	5,1	3,7	4,2	6,7	5,1	6,5
Ac.aspartique	8,9	3,6	9,7	2,4	4,4	8,5
1/2 cystine	8,7	20,6	7,7	20,5	4,7	3,9
Ac.glutamique	14,5	9,1	16,2	7,9	4,2	<u>16,5</u>
Glycocolle	14,2	6,5	9,0	6,6	<u>23,2</u>	8,8
Histidine	1,5	1,3	1,2	1,3	1,3	0,6
Leucines	8,5	2,9	11,0	5,5	6,5	12,0
Lysine	2,1	0,3	2,6	0,5	0,9	3,6
Méthionine	-	-	-	-	-	0,1
Phénylalanine	3,2	1,2	2,9	1,9	9,2	2,5
Proline	2,7	16,1	2,9	13,9	2,1	4,9
Sérine	12,0	14,2	11,2	13,2	14,5	10,0
Thréonine	6,4	11,6	6,2	10,0	3,5	6,1
Tyrosine	0,6	0,9	0,3	0,5	<u>13,0</u>	3,3
Valine	5,1	4,3	6,4	5,6	2,8	5,7

Les résultats des colonnes 1, 2, 3 et 4 sont obtenus par la méthode des DNP-amino-acides, ceux des colonnes 5 et 6 par la méthode de MOORE et STEIN. Ils sont obtenus à partir des hydrolysats chlorhydriques de 24 heures.

BIS
JUL

Le taux maximum d'extraction atteint à deux températures différentes est assez voisin de celui de 80 % obtenu par la méthode de CRESTFIELD, MOORE et STEIN (98) adaptée aux kératines par HARRAP et GILLESPIE (99) et dans laquelle la laine est réduite et extraite par le mercaptoéthanol à pH 10,5 en présence d'urée 8 M et de versène 0,001 M (sel disodique de l'acide éthylènediamine tétracétique). L'extraction dure 3 heures à la température du laboratoire.

Nous préférons toutefois procéder à une extraction en plusieurs étapes à cause des propriétés différentes des protéines isolées. En effet, les protéines extraites à 0°C et par l'extraction suivante à 50°C sont très solubles en milieu aqueux. Il n'en est pas de même pour la fraction isolée en présence d'urée. Cette dernière même à pH 10,4 (solution 0,05 M de trishydrométhylaminométhane) ne forme qu'un gel ; une dialyse contre le même tampon, mais en présence d'urée 4 M (ou 8 M) amène une solubilisation complète. Ces différences de comportement permettent de penser que les protéines ont des structures différentes. Les deux premiers temps d'extraction permettent d'isoler les deux types de protéines "pauvres en soufre" (colonne 1 et 3 du tableau XX) et "riches en soufre" (colonnes 2 et 4 du tableau XX). Les extraits à 50°C ne contiennent d'ailleurs que peu de fractions riches en soufre (5 % d'après le tableau XIX). Un autre fait important est que les fractions mineures riches en glycocolle (RG-kératines) sont extraites en majeure partie à 0°C. Les extraits à 50°C en contiennent encore des quantités appréciables mais beaucoup moins. Le fait est démontré par la comparaison des chromatographies sur gel de Sephadex G75 où le second pic (pic des RG-kératines) est diminué de plus de quatre fois. L'examen des diagrammes d'électrophorèse libre (Figure 24) confirme également ce fait. Les protéines extraites à 0°C montrent un

pic anodique très important qui correspond en majeure partie aux RG-kératines et aux SCHK-B. Les RG-kératines issus des deux extraits (à 0° et à 50°C), quoique de composition un peu différente, sont bien caractérisées par leur très haute teneur en glycocolle et en tyrosine (Colonne 5 du tableau XX).

L'électrophorèse libre des protéines de l'extrait supplémentaire à 50°C (sans urée) montre une certaine homogénéité (Figure 24). Toutefois cette fraction contient encore 5 % de protéines riches en soufre (Tableau XIX).

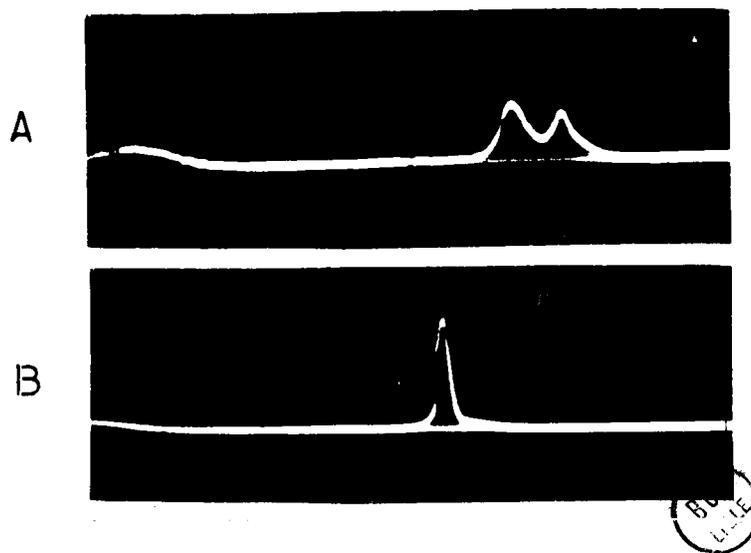


FIGURE 24

Electrophorèse libre à pH 11 des protéines extraites de la laine.

A : Extraction 16 heures à 0°C

B : Extraction supplémentaire 2 heures à 50°C

Le dernier extrait à 50°C en présence d'urée est assez particulier. Tout d'abord, il n'est soluble qu'en présence d'urée. Ensuite sa composition en amino-acides montre un taux très faible de cystine : ce qui l'apparente très nettement à la fraction pauvre en soufre. La richesse en acide glutamique renforce également cette opinion. Les teneurs en autres amino-acides sont aussi très voisines de celles de la fraction SCMK-A (2 x G75) (Tableau XII).

Il est certainement indispensable de conserver un fractionnement primaire par le thioglycolate de potassium à pH 11 et à 0°C. Cette extraction douce permet d'obtenir des protéines peu dénaturées, dont l'étude structurale peut être facilement abordée.

En conclusion, la fraction riche en soufre et les RG-kératines sont extraites en presque totalité à 0°C et à pH 11. De plus l'extrait à 0°C contient une importante quantité de SCMK-A. Une deuxième extraction à 50°C pendant 2 heures permet d'isoler une fraction pauvre en soufre ne contenant que 5 % de fraction riche en soufre et des RG-kératines. Toutes ces fractions sont solubles en milieu légèrement alcalin.

Une extraction complémentaire à 50°C en présence d'urée 8 M permet de solubiliser une fraction de même composition que la fraction pauvre en soufre, mais dont la teneur en soufre cystinique est nettement plus faible. Cette fraction forme un gel en solution neutre ou alcaline et ne se dissout qu'en présence d'urée 8 M.

III - HETEROGENEITE DE LA FRACTION PAUVRE EN SOUFRE

Les SCMK forment un mélange complexe de 4 groupes de protéines comprenant deux groupes majeurs : SCMK-A (pauvres en soufre) et SCMK-B (riches en soufre) et deux groupes mineurs : SCMK(RG) définies au chapitre précédent et SCMK-M que nous

définissons plus loin. Ces quatre groupes ont une tendance très prononcée à former des agrégats protéiques qu'il est difficile de dissocier. Le nombre des méthodes de préparation des SCMK-A sont en général fondées sur les propriétés physico-chimiques des différentes fractions à séparer. L'élimination partielle des SCMK-RG peut être effectuée par des extractions sélectives à pH 10,5 à l'aide de thioglycolate de potassium 0,1 M et à 50°C (GILLESPIE et LENNOX) (100). L'élimination des SCMK-B est obtenue par une précipitation au voisinage de leur point isoélectrique en milieu de force ionique 0,4 (GILLESPIE et al.) (101). Les SCMK-B peuvent aussi être extraites sélectivement par le thioglycolate de potassium 0,8 M à pH 11 et à 0°C (GILLESPIE) (102). Une extraction ultérieure des SCMK-A peut être faite en soumettant la fibre résiduelle à une plasmolyse à basse température selon HARRAP et GILLESPIE (103).

L'ensemble des préparations obtenues par ces méthodes tout en satisfaisant à un certain nombre de critères physico-chimiques de pureté (homogénéité en électrophorèse libre et en ultracentrifugation) contient encore des quantités appréciables de protéines riches en glyco-colle, sérine et tyrosine. L'élimination complète et l'isolement de ces SCMK-RG n'est possible que par des méthodes chromatographiques : filtration sur gel de Sephadex G75 et G100. L'application systématique de cette méthode nous a montré que les protéines riches en glyco-colle pouvaient être extraites des cellules orthocorticales de la laine (BISERTE et MOSCHETTO) (104), de la laine vierge (MOSCHETTO et BISERTE) (105) ou encore des α -kératoses (MOSCHETTO et BISERTE) (106). Il apparaît donc que ces protéines accompagnent toutes les préparations de SCMK-A ou d' α -kératoses. Cette constatation nous a amené à choisir le mode de fractionnement schématisé dans le tableau XXI et applicable à toutes les préparations de protéines pauvres en soufre.

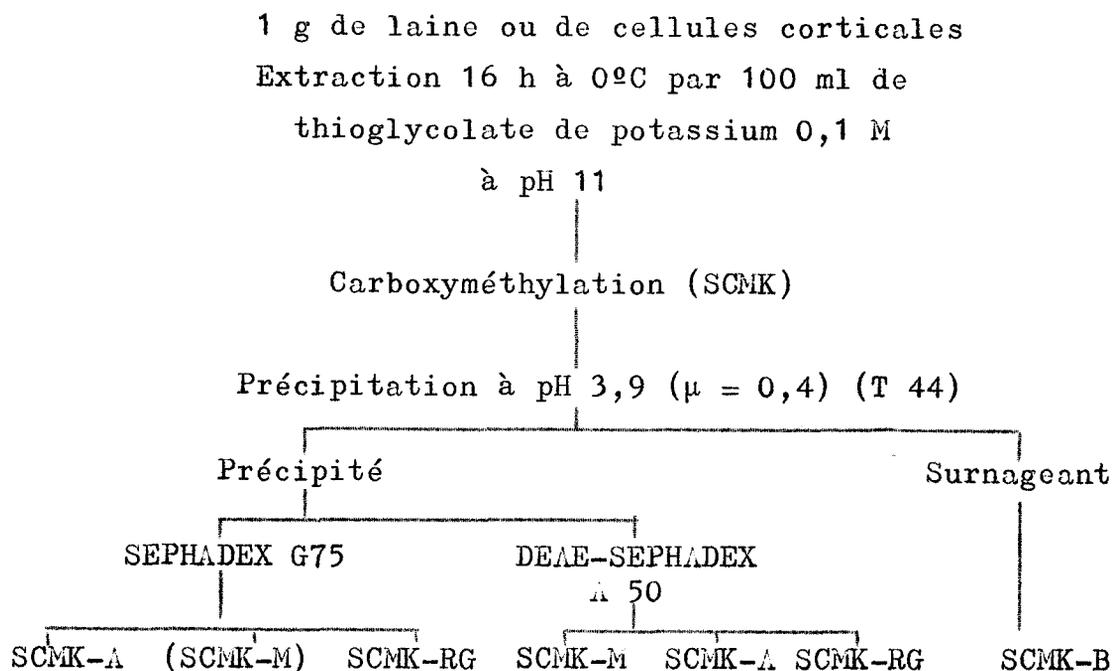
La composition en amino-acides des fractions ainsi extraites de la laine vierge est identique à celles extraites des cellules corticales (MOSCHETTO, DAUTREVAUX et BISERTE) (107) (voir tableau XII). Cependant, la teneur en tyrosine des SCMK-RG extraites des cellules corticales est plus faible que dans le cas des SCMK-RG de la laine. En plus de la présence des SCMK-RG les SCMK-A sont généralement souillées par une fraction très complexe qui peut être mise en évidence par chromatographie sur DEAE-Sephadex (fractions 1 à 3 de la figure 25 A et de la figure 25 B). Elle est révélée en électrophorèse en gel d'amidon comme un ensemble de bande s'étendant dans la zone médiane de l'électrophorégramme entre les SCMK-A et les SCMK-B (fractions 1 à 3 de la figure 26 A et de la figure 26 B). Leur position médiane dans le diagramme d'électrophorèse est à l'origine de l'abréviation SCMK-M que nous avons choisie pour les désigner. Ces protéines sont très riches en sérine et moyennement riches en glycolle. Ce qui les distingue surtout des SCMK-RG est leur teneur assez faible en tyrosine. Leur composition en amino-acides est donnée dans le tableau XXIV.

IV - METHODES DE FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES SCMK

A) Fractionnement sur DEAE-Sephadex (T 29)

Le fractionnement des SCMK ou des SCMK-A sur DEAE-Sephadex, outre la mise en évidence des SCMK-M, rend possible l'isolement des différentes classes de protéines sans avoir recours à un fractionnement arbitraire, puisque chacune d'elles est parfaitement définie dans le diagramme d'élution.

La caractéristique essentielle du DEAE-Sephadex est de permettre d'isoler et de distinguer très facilement les deux classes majeures des kératines SCMK-A et SCMK-B ainsi que les deux classes mineures SCMK-M et SCMK-RG.

TABLEAU XXI

Cette distinction est valable quelles que soient les conditions expérimentales choisies. Le meilleur fractionnement est obtenu en présence d'urée 4M.

Toutefois suivant le but recherché, les conditions opératoires peuvent être modifiées. Si on désire obtenir très rapidement une fraction SCMK-A très enrichie en composants rapides on choisira la chromatographie sur petite colonne (Figure 27 A) qui donne un fractionnement voisin de celui obtenu sur DEAE-cellulose (Figure 29 A). Si on veut obtenir la même fraction non souillée par les SCMK-M on utilisera une colonne de plus grande dimension pour faire intervenir davantage le tamisage moléculaire (Figure 27 B). L'isolement des SCMK-M est facilement obtenu sur des colonnes de 60 cm environ et en présence d'urée 4 M. (voir plus haut figure 25).

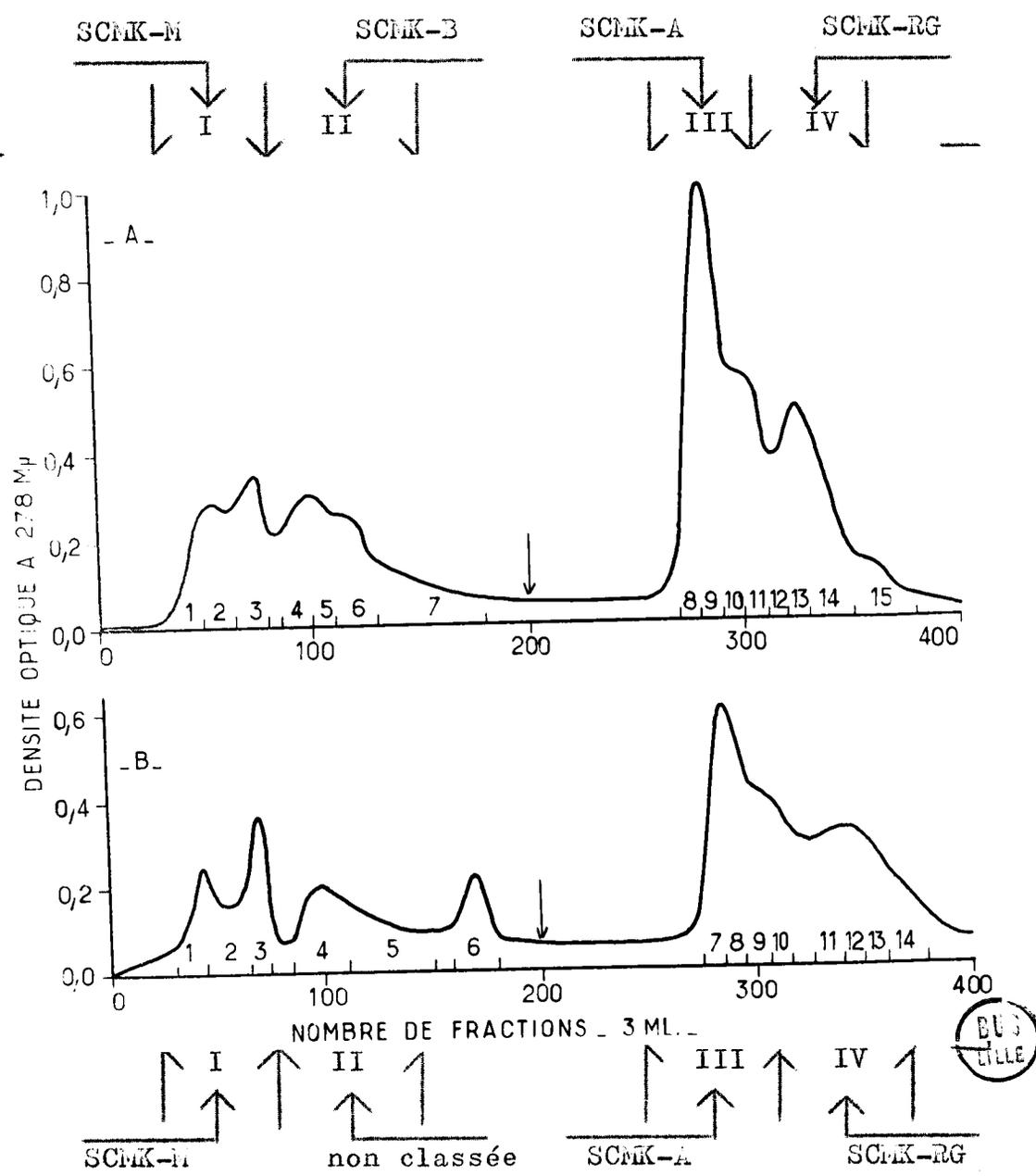


FIGURE 25

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX

(Colonne de 62 cm de haut x 2,1 cm de diamètre). (Tampon Tris 0,05 M, NaCl 0,25 M), (urée 4 M de pH 10,4).

La flèche indique le début du gradient de NaCl 0,25 M à 1 M.
A : SCMK (Laine Mérinos)
B : SCMK-A (Laine Mérinos)

La délimitation, l'indentification et l'ordre d'éluion des différentes fractions portés à l'extérieur de la figure rappellent les résultats du tableau XXII.

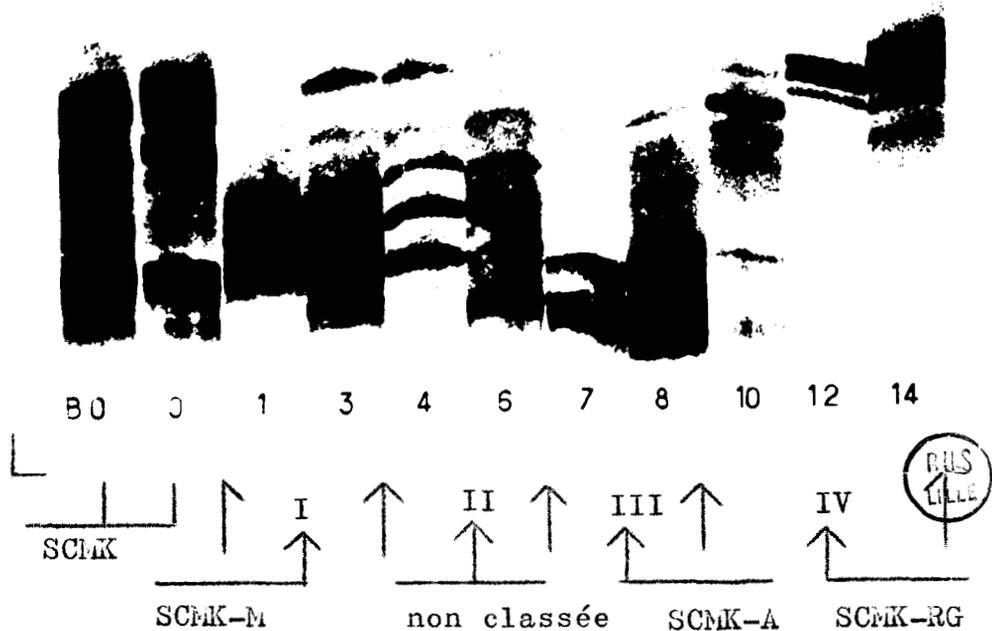
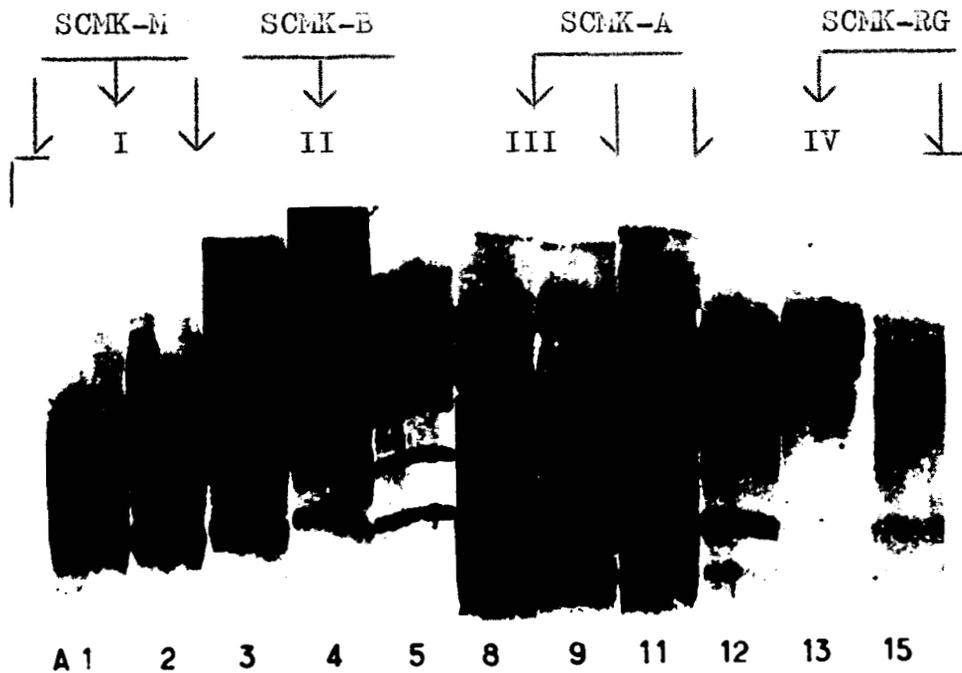


FIGURE 26

ELECTROPHORESE SUR GEL D'AMIDON DES FRACTIONS DE LA FIGURE 25

- A : SCM-K fractionnées sur DEAE-SEPHADEX
- B : SCM-K-A fractionnées sur DEAE-SEPHADEX (les fractions B 0 représentent les électrophorèses de SCM-K non fractionnées).
L'identification et l'ordre d'éluion des différentes fractions portés à l'extérieur de la figure rappellent les résultats du tableau XXII.

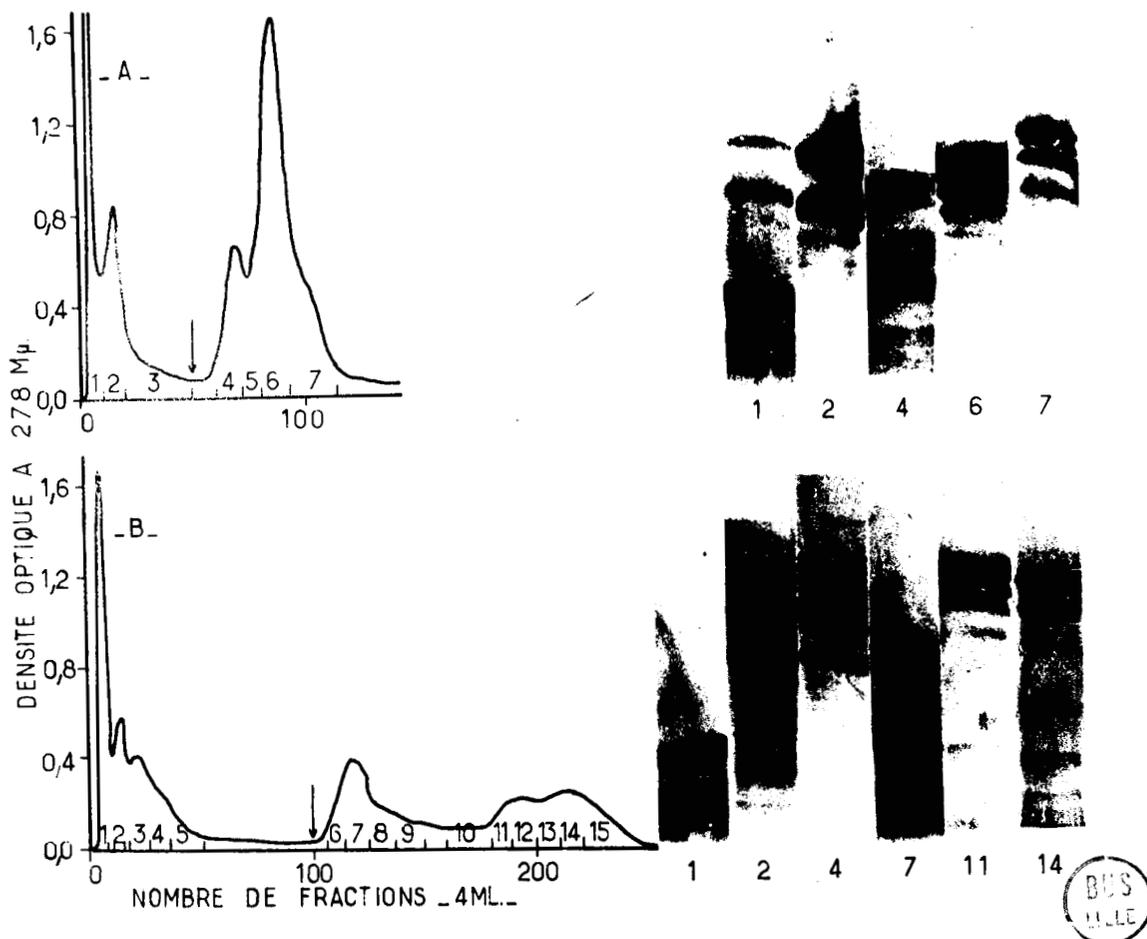


FIGURE 27

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX DES SCMK (Laine Mérinos)
 (Tampon Tris de pH 10,4, sans urée)

- A - A gauche : Diagramme d'élu-tion sur une colonne de 11 cm de hauteur et 1 cm de diamètre. La flèche indique le début du gradient linéaire de NaCl (100 ml 0,25 M et 100 ml 1 M dans 2 cellules cylindriques de 20 cm de hauteur et 3 cm de diamètre.
- A droite : Electrophorèse sur gel d'amidon des fractions distinctes éluées (T 17)
- B - A gauche : Diagramme d'élu-tion sur une colonne de 20 cm de hauteur et 1,8 cm de diamètre. La flèche indique le début du gradient linéaire de NaCl (300 ml 0,25 M et 300 ml 1 M dans 2 cellules cylindriques de 15 cm de hauteur et de 6 cm de diamètre.
- A droite : Electrophorèse sur gel d'amidon des fractions distinctes éluées (T 17)

B) Chromatographie sur Sephadex G200 (T 25)

La chromatographie des SCMK sur Sephadex G200 (Figure 28) facilite encore le fractionnement, car elle permet d'isoler chacune des fractions en une seule étape. Ce type de chromatographie permet d'ailleurs un sous-fractionnement des SCMK-A défini par O'DONNELL et THOMPSON (108) ; ce sous-fractionnement n'a d'ailleurs lieu que dans des conditions techniques bien précises (en particulier débit assez rapide des colonnes et faible force ionique du tampon), mais dans ce cas il n'y a pas de séparation des 3 autres classes (SCMK-B, SCMK-RG et SCMK-M).

C) Chromatographie sur DEAE-cellulose (T 21)

La chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 10,4 (figure 29 A) permet un isolement sélectif des SCMK-B et SCMK-RG (figure 29 B).

L'ensemble des résultats obtenus est schématisé dans le tableau XXII.

V - CLASSIFICATION DES S-CARBOXYMETHYLKERATINES DE LA LAINE

L'ensemble des fractionnements décrits ou cités et leur analyse en électrophorèse sur gel d'amidon confirment la grande complexité des SCMK extraites de la laine Mérinos. En interprétant leurs électrophorèses sur gel d'amidon, qui sont particulièrement bien définies dans la zone lente (SCMK-A), O'DONNELL et THOMPSON (109) ont pu dénombrer 8 fractions numérotées de 1 à 8 de la cathode vers l'anode. Notre étude montre que les SCMK de cette zone sont encore bien plus complexes et qu'en réalité les fractions révélées sur le diagramme total de la laine sont en général diffuses et proviennent de la superposition de fractions nettement définies et de fractions naturellement diffuses. Les résultats obtenus par O'DONNELL et THOMPSON (110) à l'aide de leur fractionnement sur DEAE-cellulose, en présence d'urée 8 M, confirment d'ailleurs cet aspect du problème. Il importe donc

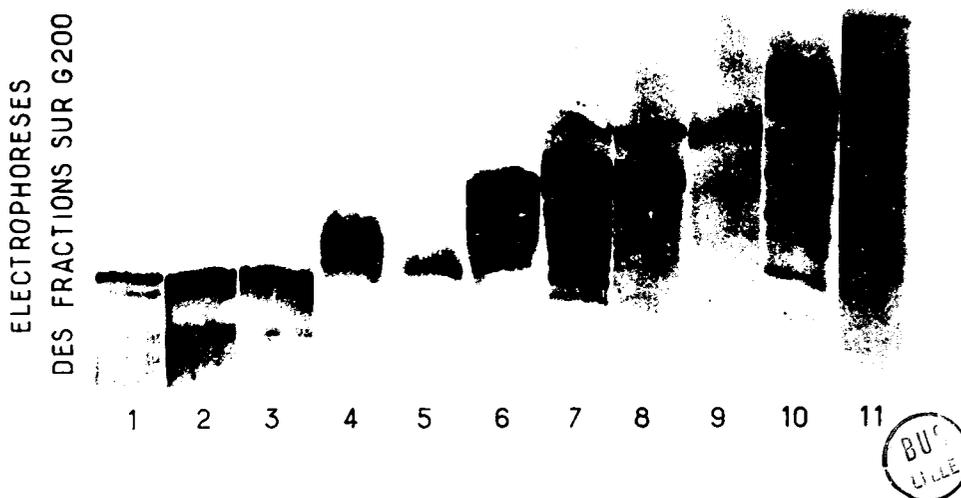
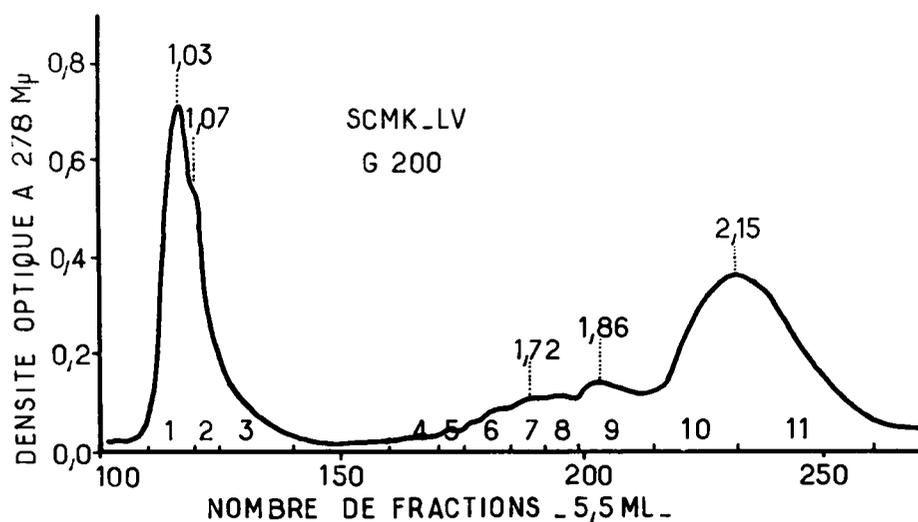


FIGURE 28

Chromatographie sur Sephadex G200 des SCMK (laine Mérinos)

Tampon Tris 0,076 M, acide citrique 0,005 M, sel disodique de l'EDTA 0,01 M, NaCl 0,5 M, urée 4 M, pH 8,6 ; colonne de 108 cm de haut x 4,4 cm de diamètre.

En haut : diagramme d'éluion (les nombres placés au niveau du sommet des pics indiquent la valeur du rapport V_e/V_o (voir tableau XXII)).

SCMK-A : $V_e/V_o = 1,03 - 1,07$

SCMK-M : $V_e/V_o = 1,72$

SCMK-B : $V_e/V_o = 1,86$

SCMK-RG : $V_e/V_o = 2,15$

En bas : Electrophorèse sur gel d'amidon des fractions éluées.

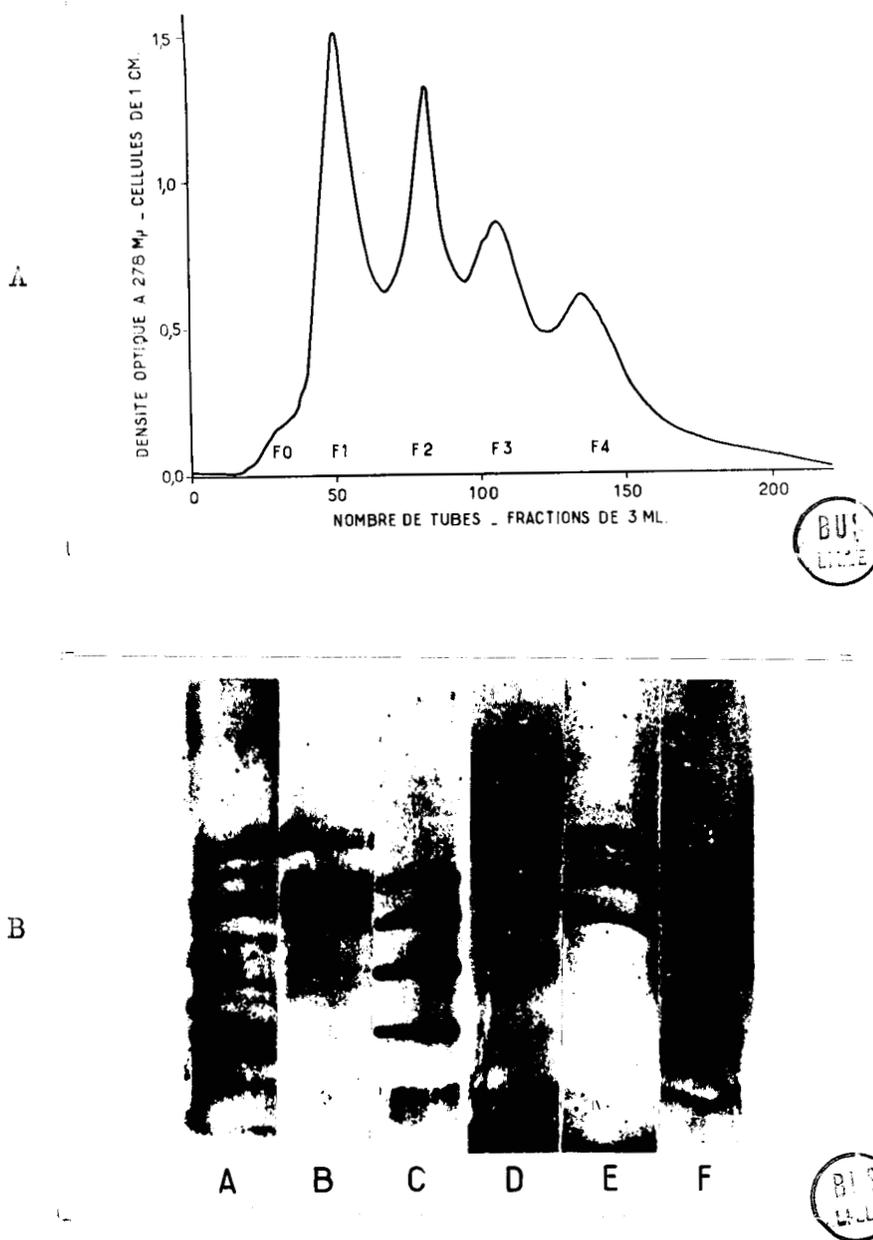


FIGURE 29

- A : Diagramme d'élution des SCMK sur DEAE-cellulose en tampon Tris 0,05 M de pH 10,4 - Colonne de 23 cm de haut x 2,2 cm de diamètre. Gradient linéaire de NaCl 0 à 1 M.
- B : Electrophorèse sur gel d'amidon des fractions éluées (Figure 29 A).
- A : SCMK non fractionnées
 - B : F1 SCMK-B
 - C : F2 non classée
 - D : F3 SCMK-RG
 - E : F4 ensemble non classé ; la bande médiane intense est SCMK-RG 2,35/2,42
 - F : Fraction éluee en milieu urée 8 M à la fin du gradient.

TABLEAU XXII

METHODES DE FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES SCMK

Méthode chromatographique utilisée	Ordre d'éluion des fractions			
	I	II	III	IV
DEAE-cellulose (pH 10,4) (voir la figure 29)	SCMK-B	non classée	SCMK-RG	non classée
SEPHADEX G75 (urée 8 M ou 4 M, pH 8) (voir la figure 17)	SCMK-A	SCMK-RG (SCMK-B)		
SEPHADEX G200 (urée 4 M, pH 8,6) (voir la figure 28)	SCMK-A $V_e/V_o =$ 1,03-1,07 (**)	SCMK-M $V_e/V_o =$ 1,72	SCMK-B $V_e/V_o =$ 1,86	SCMK-RG $V_e/V_o =$ 2,15
DEAE-SEPHADEX (*) (urée 4 M, pH 10,4) (voir la figure 25)	SCMK-M 1, 2 (3)	SCMK-B (3) 4-5- 6-7	SCMK-A 8-9 (10) (11)	SCMK-RG (10)(11) 12,13, 14 (15)

(*) Les nombres au dessous du nom des fractions correspondent au fractionnement de la figure 25 A et à l'étude électrophorétique des fractions éluées (Figure 26 A).

Ceux qui sont mis entre parenthèses représentent des fractions éluées dans deux zones voisines.

(**) V_e/V_o : il s'agit du rapport du volume d'éluion (V_e) d'une protéine déterminée au volume mort (V_o) de la colonne utilisée (mesuré par le volume d'éluion d'un composé de haut poids moléculaire (T 19)).



de proposer une nomenclature simple, susceptible de s'adapter à la grande diversité des kératines, et qui permette un repérage précis de leur position sur l'électrophorégramme.

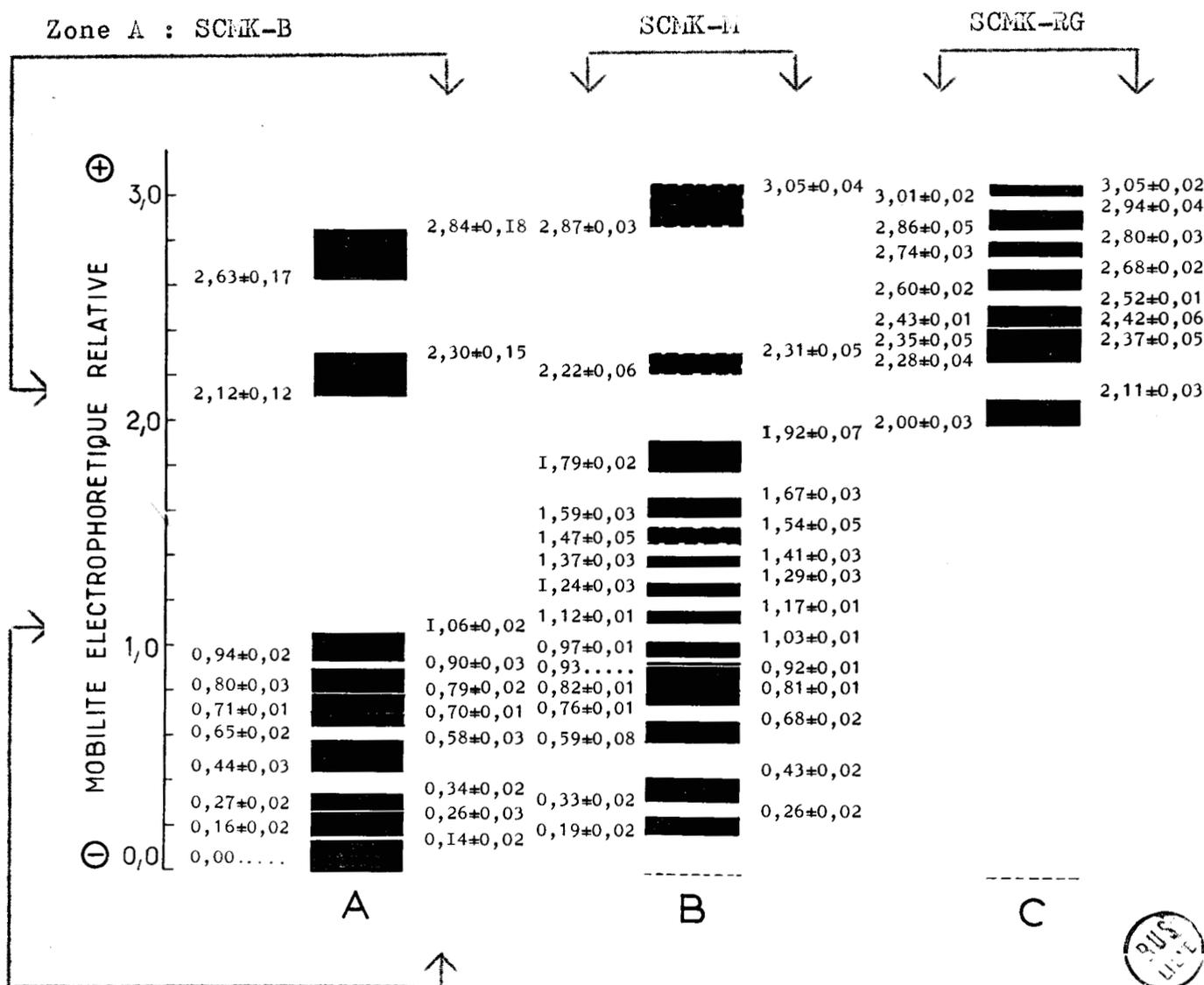
Dans ce but, nous avons choisi de définir la position de chaque protéine par une mobilité relative (U_r) par rapport à une fraction bien définie. La fraction protéique de référence correspond à la bande la plus rapide de la zone des SCMK-A qui est aussi la plus intense de l'électrophorégramme des SCMK. Elle correspond à la zone 0,94/1,06 (*) du tableau XXIII. Sur ce tableau, la fraction pauvre en soufre SCMK-A du diagramme total des SCMK est représentée par l'ensemble des protéines des zones A et B s'étalant de la mobilité 0 à 1. La fraction riche en soufre SCMK-B est représentée par les deux bandes de mobilité 2,12 à 2,84 de la zone A. Il convient encore d'ajouter comme appartenant à cette fraction une zone frontale, très diffuse et peu colorable accompagnée d'un front très coloré (fraction 3 de la figure 26 A). Cette frontière n'est pas répertoriée dans le tableau

La zone B représente les SCMK-M dont les constituants les moins rapides sont en général associés aux SCMK-A (fractions 1 et 3 de la figure 26 B) ajoutant encore à la complexité déjà grande de cette fraction.

La zone C représente l'ensemble des protéines appartenant aux SCMK-RG. Ce schéma électrophorétique a été réalisé en tenant compte des fractionnements sur DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex et Sephadex G75. De plus nous avons utilisé les résultats

(*) Ces deux valeurs correspondent à la mobilité relative du début et de l'extrémité de la bande envisagée.

TABLEAU XXIII
 MOBILITES RELATIVES (U_r) DES SCMK DE LA LAINE MERINOS



Zone A : SCM-K-A

Zone A : SCM-K-A : $0,00 < U_r < 1,06$; (en rouge la bande de référence).
 SCM-K-B : $2,12 < U_r < 2,84$.

Zone B : Zone complexe des SCM-K-M : $0,19 < U_r < 1,92$ sauf la bande 1,47/1,54

Bande 1,47/1,54 : voir fraction A5, figure 26. (non classée)

Bande 2,22/2,31 : voir fraction A15, figure 26. (SCM-K-RG)

Bande 2,87/3,05 : voir fraction A9, figure 26. (non classée)

Ces trois bandes délimitées par des pointillées sont incluses dans la zone B pour rendre le tableau plus lisible.

Zone C : SCM-K-RG.



tats obtenus à l'aide des gels de Sephadex G200 et de polyacrylamide P300 ainsi que les résultats obtenus à l'aide de l'électrophorèse préparative en veine liquide. Les mobilités indiquées sont des valeurs moyennes calculées pour un nombre de mesures variant entre 6 et 13 suivant les fractions. Certes les mobilités sur gels d'amidon ne peuvent être définies avec autant de rigueur qu'en électrophorèse libre. Toutefois, dans des conditions expérimentales bien standardisées elles permettent d'identifier avec exactitude une protéine. En cas de doute, il est toujours possible de rattacher cette protéine à un des 4 groupes des SCMK soit par sa composition en amino-acides, soit en la soumettant à une chromatographie dans un système adéquat et de l'identifier sans ambiguïté. La nomenclature proposée permet une identification sans équivoque d'une protéine quelconque. Par exemple SCMK-B (2,12/2,30) désigne la première bande électrophorétique des protéines riches en soufre, la deuxième étant SCMK-B (2,63/2,84), etc.... On voit immédiatement que ces deux fractions sont situées sur les gels d'amidon à des distances du point de dépôt égales 2,2 et 2,7 fois respectivement la distance de SCMK-A (0,94/1,06) qui est la protéine étalon.

VI - ISOLEMENT ET PROPRIETES DE QUELQUES PROTEINES EN RAPPORT AVEC LEUR COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE

Le couplage judicieux de plusieurs méthodes chromatographiques permet l'isolement d'un certain nombre de protéines dont l'homogénéité en électrophorèse sur gel d'amidon est satisfaisante puisqu'on ne révèle qu'une seule bande majeure.

Par couplage de la chromatographie sur DEAE-cellulose (en urée 8 M) et de la filtration sur Sephadex G200, O'DONNELL et THOMPSON (111) isolent la protéine SCMK-A 0,95/1,06, suivant la définition du tableau XXIII.

A) Le couplage de la chromatographie sur DEAE-cellulose (pH 10,4) et de la chromatographie sur DEAE-Sephadex permet l'isolement d'une protéine de la classe des SCMK-RG (fraction 3 de la figure 30). Cette protéine SCMK-RG (2,35/2,42) est caractérisée par une forte teneur en glyco-colle et en sérine (tableau XXIV). Sa teneur en tyrosine, quoique forte, est moins élevée que celle des SCMK-RG non fractionnées.

B) Le couplage de la filtration sur Sephadex G200 et de la chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 8 permet d'isoler une fraction riche en soufre (fraction 6 de la figure 30) qui présente un état de pureté très avancé. Cette protéine SCMK-B (2,63/2,84) est bien caractéristique de la fraction riche en soufre avec une teneur élevée en S-carboxyméthylcystéine, en proline et en sérine (Tableau XXIV). La carte électrochromatographique des peptides de son hydrolysate trypsique (figure 31 A) est nettement plus simple que celle des hydrolysats tryptiques de protéines totales de laine ou des SCMK-A (figure 31 B).

C) Le fractionnement sur Sephadex G200 permet en outre une séparation complète des SCMK-B (figure 32 A). Quelques considérations relatives à l'hétérogénéité de cette fraction découlent de son comportement sur Sephadex G200. Le fractionnement (figure 32 A) fait apparaître deux zones majeures pour lesquelles les rapports V_e/V_o sont respectivement de 1,82 et de 2,00 ce qui correspond à des poids moléculaires de 29.000 et de 16.000. D'autres protéines sont encore éluées, qui ont un coefficient d'extinction à 278 m μ très faible. Leur point d'élu-tion moyen correspond à un rapport V_e/V_o de 2,3, soit à un poids moléculaire moyen de 5.000. L'ensemble de ces valeurs et l'hétérogénéité ainsi révélée permettent peut-être d'expliquer les différences de poids moléculaire trouvées par GILLESPIE (112) à l'aide de la méthode d'ARCHIBALD (18.000 et 21.000) qui diffèrent

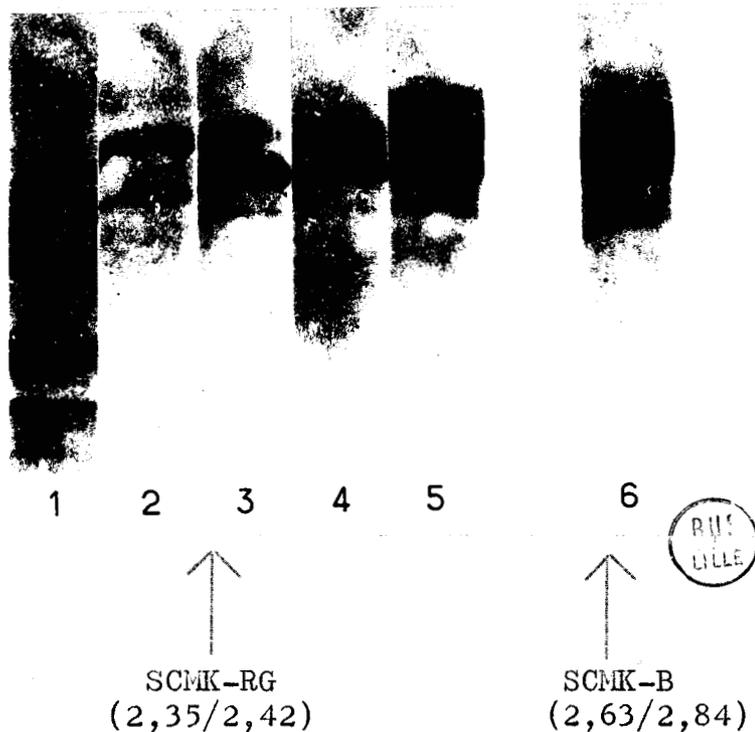


FIGURE 30

Etude électrophorétique (fractions 1 à 5) du fractionnement sur DEAE-Sephadex (zone des SCMK-RG de la fraction 4 obtenue sur DEAE-cellulose (Figure 29).

Fraction 6 : électrophorégramme de SCMK-B 2,63/2,84 (voir le texte).

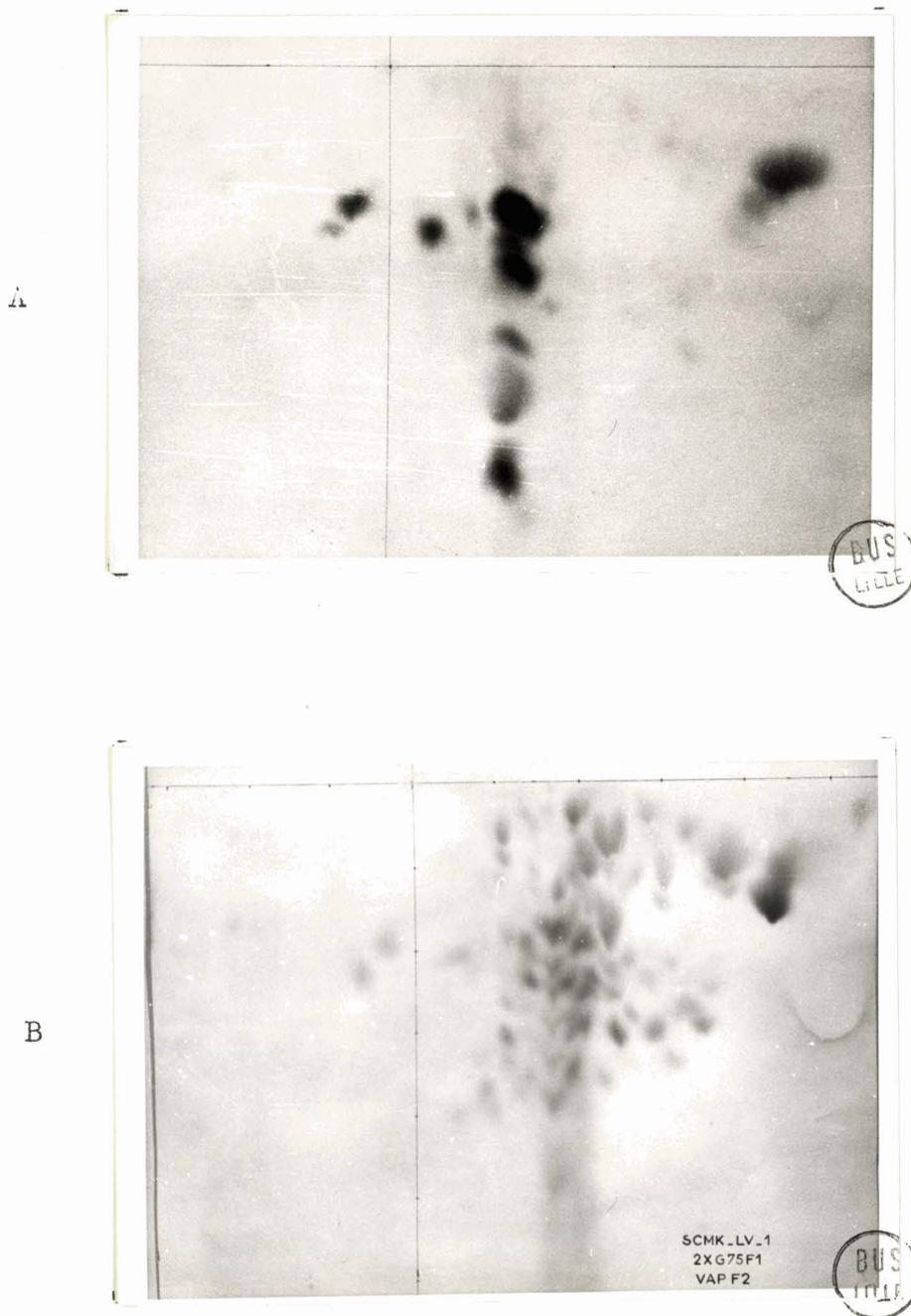


FIGURE 31

A : Electrochromatographie de l'hydrolysats trypsique de SCMK-B (2,63/2,84).

B : Electrochromatographie de l'hydrolysats trypsique d'une fraction de SCMK-A.

(Electrophorèse à pH 3,9 et chromatographie dans le système n-butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) (T 16)).

TABLEAU XXIVCOMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE SCM_K PURIFIÉES ET DES
SCM_K-M (*)

(nombre de résidus d'acides aminés pour 100 acides aminés)

	SCM _K -RG 2,35/2,42	SCM _K -B 2,63/2,84	SCM _K -M	
			Fraction 1 (***)	Fraction 2 (***)
Alanine	4,4	4,1	4,3	3,9
Arginine	2,3	3,6	-	-
Ac.aspartique	7,4	6,6	6,7	6,2
Ac.cystéique	2,0	-	-	-
SCM _C (**)	6,5	<u>12,0</u>	4,8	8,3
Ac.glutamique	2,7	8,7	11,8	8,9
Glycocolle	29,0	7,5	12,9	16,6
Histidine	0,6	1,9	1,7	1,5
Isoleucine	-	3,1	2,3	1,6
Leucine	3,7	6,0	10,0	8,0
Lysine	0,7	0,7	3,0	1,6
Phénylalanine	6,2	3,0	5,6	5,8
Proline	3,4	<u>10,6</u>	3,3	3,3
Sérine	12,2	<u>13,1</u>	19,0	18,0
Thréonine	2,5	11,7	6,8	8,4
Tyrosine	<u>12,7</u>	2,1	4,0	4,7
Valine	3,6	5,3	3,9	3,3

(*) déterminé par la technique de MOORE et STEIN sur des hydrolysats chlorhydriques sous vide de 24 h.

(**) S-carboxyméthylcystéine.

(***) Les SCM_K-M sont éluées sur DEAE-Sephadex en début de chromatographie sous forme de deux pics (fractions 1 et 3 de la figure 25 B).

BUS
LIFE

de ceux déterminés par HARRAP (113) par la méthode des tensions superficielles (8.000 et 10.000).

D) Le comportement des SCMK-A sur Sephadex G200 permettrait d'attribuer à cette fraction un poids moléculaire supérieur à 160.000 puisqu'elles sont éluées avant les γ -globulines (P.M. 165.000). Toutefois, les conclusions à ce sujet sont délicates, car le comportement des SCMK-A sur Sephadex est tout à fait différent suivant qu'elles sont chromatographiées isolément (figure 28) ou en présence d'autres protéines (figure 32 B)(*). La chromatographie en présence de γ -globulines (P.M. 165.000) et de sérumalbumine bovine (P.M. 67.000) montre que les SCMK-A peuvent être éluées jusque dans la zone de la sérumalbumine, ce qui correspond à un poids moléculaire de l'ordre de 70.000. Il semble donc qu'en gel-filtration, au moins dans le cas des SCMK, l'interaction des protéines les unes sur les autres puisse modifier considérablement leur comportement. Les valeurs des poids moléculaires qu'on peut en déduire au stade actuel de cette étude ne sont donc qu'approchées.

VII - ORIGINE DES KERATINES RICHES EN GLYCOCOLLE (SCMK-RG).

A) INTRODUCTION

L'isolement de protéines riches en glycolle à partir des SCMK-A ou des α -kératoses, nous a conduit à aborder le problème de leur origine. Dans ce but, différentes expériences qui seront discutées à la fin de cette étude ont été entreprises. Toutes ces expériences visent l'isolement de protéines de mêmes propriétés que les SCMK-RG par des méthodes d'extraction variées (extraction par la soude et traitements acides).

B) EXTRACTION DE LA LAINE PAR LA SOUDE N/10 (T 56)

À 50°C le taux d'extraction déterminé par pesée est de 23,5 % et de 25,6 % par dosage de l'azote. Cette différence s'explique vraisemblablement par une fixation du sodium sur les

(*) Voir la discussion des résultats d'étalonnage des colonnes de Sephadex en vue de la détermination des poids moléculaires (T 19).

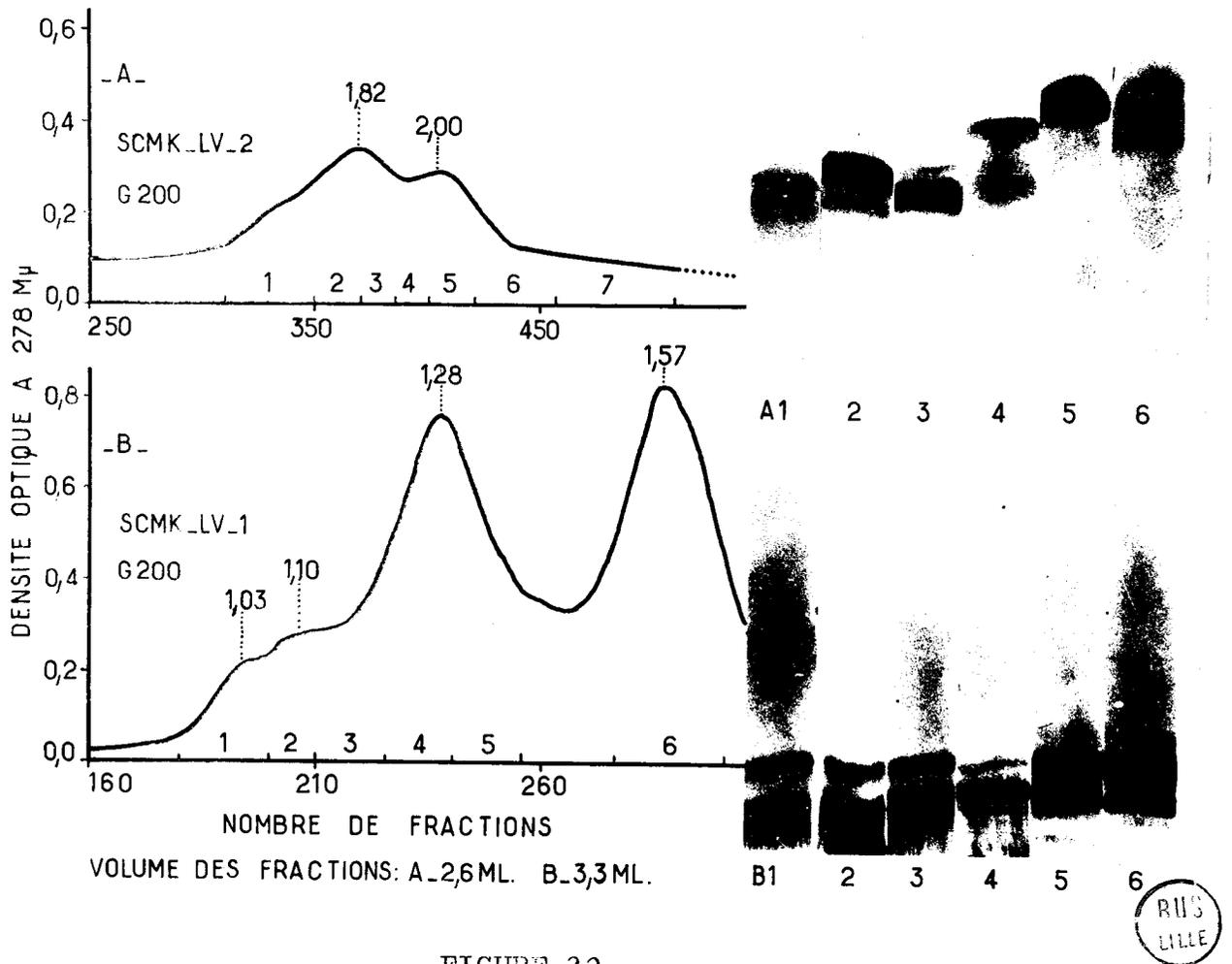


FIGURE 32

- A - à gauche : Chromatographie sur Sephadex G200 des SCM-B ;
mêmes conditions expérimentales que pour la figure 28.
- à droite : Etude électrophorétique en gel d'amidon des fractions éluées.
- B - à gauche : Chromatographie sur Sephadex G200 d'un mélange de SCM-A, de γ -globulines et de sérumalbumine bovine qui sont ajoutées comme "marqueurs" de poids moléculaire.
- à droite : Etude électrophorétique sur gel d'amidon des fractions éluées (la bande la plus rapide et la plus intense sur l'électrophorégramme de la fraction 6 appartient à la sérumalbumine).

fonctions acides libres des kératines. Cette remarque a pour conséquence que les taux d'extraction faibles ne peuvent être déterminés que par dosage de l'azote au par pesée des protéines extraites. Tel est le cas de la détermination du taux d'extraction de la laine par la soude N/10 à 0°C (T 37). Il est de 2 % si on l'évalue par dosage de l'azote alors que sa détermination par pesée de la laine résiduelle indiquerait un taux de l'ordre de 0 % à cause d'une reprise de poids de la laine d'environ 2 % due au traitement sodique.

Détermination des groupes α -aminés terminaux libres

Les extraits sodiques (à 50°C) sont acidifiés par HCl pour éliminer le CO₂ provenant de la carbonatation de la soude au cours de l'extraction. Après neutralisation un passage sur Dowex 50 x 4 permet d'éliminer les sels de sodium ainsi que des traces d'une fraction protéique qui trouble légèrement les eaux de rinçage. Les extraits sont ensuite élués à l'ammoniaque 2 M et les éluats sont lyophilisés. C'est seulement après ce traitement que l'on détermine la nature des extrémités N-terminales des constituants de l'extrait.

La faible quantité de protéines non fixée sur la résine possède la sérine et la thréonine comme amino-acides N-terminaux ainsi qu'une petite quantité d'acide glutamique et de glyco-colle.

Quant à l'extrait sodique lui-même après dinitro-phénylation, il peut se diviser en trois fractions distinctes par leur solubilité.

- 1^o) Une fraction éthérosoluble en milieu acide correspondant aux amino-acides libres énucléés des chaînes protéiques.
- 2^o) Une fraction soluble en milieu acide restant dans la phase aqueuse.
- 3^o) Une fraction précipitable en milieu acide.

Les amino-acides libres de la première fraction sont principalement comme l'a décrit FIGACHE (114) le glyocolle et la sérine, mais on trouve aussi une quantité appréciable de lysine. Les extrémités N-terminales des deux autres fractions sont constituées en majeure partie par de la sérine et de la thréonine, le glyocolle n'apparaît qu'en quantité nettement moindre.

Composition en acides aminés

La composition en amino-acides de l'extrait sodique total n'offre que peu d'intérêt à cause de sa complexité. Aussi, l'avons-nous soumis avant toute analyse à un fractionnement sur Sephadex G75 en vue de séparer les différents fragments protéiques en fonction de leurs dimensions moléculaires. 3 fractions peuvent être obtenues qui, après rechromatographie (figure 33) sont analysées. Les fractions 1 et 2 ne sont pas particulièrement riches en glyocolle, elles sont très riches en acides glutamique, aspartique et en leucines. La fraction 3 est par contre très riche en glyocolle, en sérine et en tyrosine. Les extraits sodiques à 0°C ont les mêmes caractéristiques de composition que cette fraction 3. (voir le Tableau XXV).

C - TRAITEMENTS ACIDES

Nous venons de voir que le traitement de la laine par la soude conduisait à l'isolement d'une fraction protéique riche en glyocolle, sérine et tyrosine.

Cela ne prouve pas nécessairement que l'origine des protéines riches en glyocolle ait sa cause dans une attaque alcaline des liaisons peptidiques. Un moyen de vérifier ce point de vue est de préparer des kératoses selon la méthode de HAYLETT et coll. (115) (T 59). Dans cette technique, toutes les étapes de la préparation se font en milieu acide depuis l'oxydation jusqu'à l'extraction qui se fait à un pH inférieur à 7. Dans ce cas les kératoses (kératoses précipitables vers pH 4) dérivées des kératoses ainsi extraites contiennent des protéines riches en

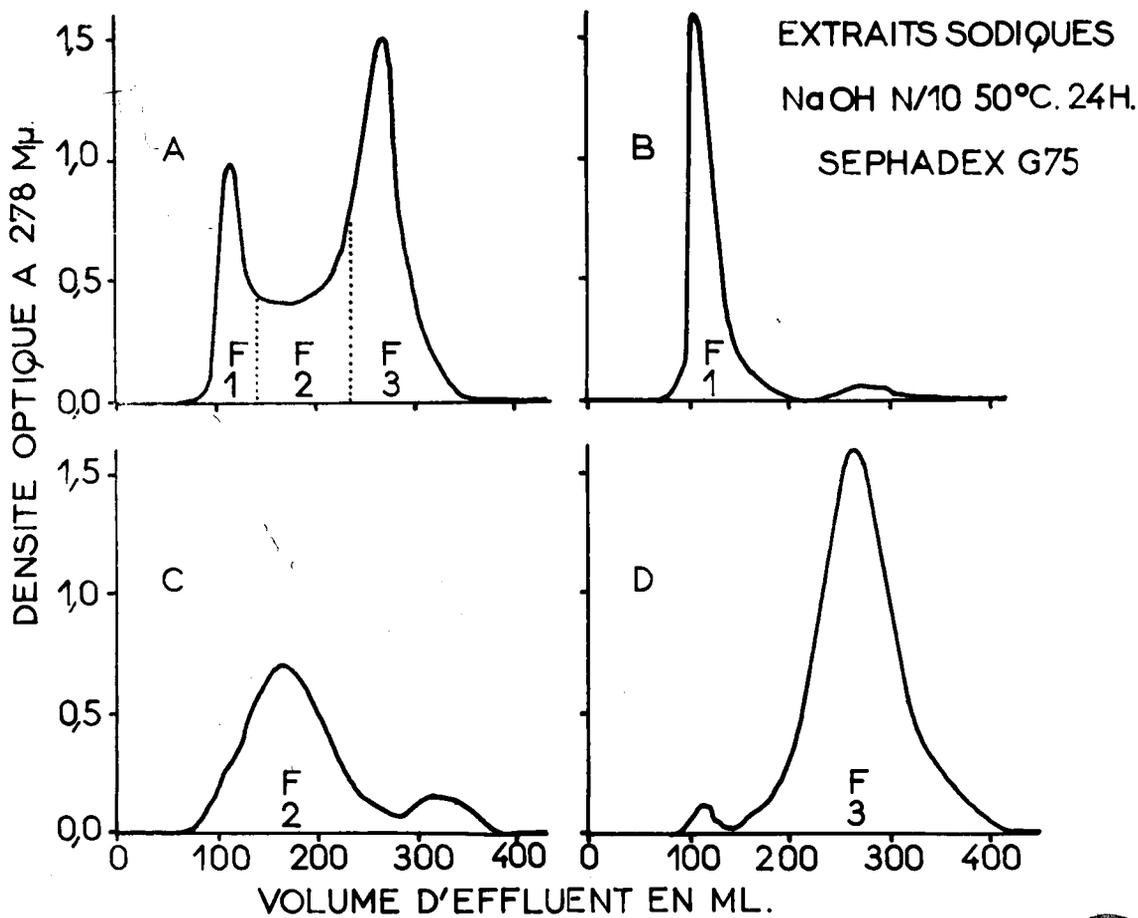


FIGURE 33

A : Chromatographie sur Sephadex G75 des protéines extraites par la soude N/10 à 50°C.

B - C-D : Rechromatographie des différentes zones de l'éluat de la figure 33 A.



TABLEAU XXV

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES KERATINES RICHES EN GLYCOCOLLE
(nombre de résidus d'amino-acides pour cent acides aminés).

	PROTEINES EXTRAITES PAR LA SOUDE N/10				SCMK-RG issue de SCMK-A(LV) NON FRACTIONNEE
	50°C - 24 h			0°C - 24 h	
	FRACTIONS SUR SEPHADEX G75			NON	
	F1	F2	F3	FRACTIONNEES	
	1	2	3	4	5
Alanine	8,4	6,5	3,7	3,3	1,6
Arginine	7,0	7,3	3,9	5,7	5,2
Ac.aspartique	10,4	10,6	6,4	3,9	3,0
Ac.cystéique	0,5	0,9	2,7	1,5	
1/2 cystine	0,6	0,7	1,5	-	8,1(*)
Ac.glutamique	18,2	18,1	6,5	4,2	1,4
Glycocolle	7,5	6,5	<u>21,5</u>	<u>23,3</u>	<u>30,3</u>
Histidine	0,6	2,4	-	2,2	traces
Isoleucine	4,5	3,0	2,2	0,8	traces
Leucine	10,8	11,2	6,6	6,8	5,7
Lysine	0,5	2,9	1,0	1,5	traces
Méthionine	0,4	0,8	-	traces	-
Phénylalanine	3,3	2,5	5,7	7,7	6,7
Proline	2,4	2,6	3,8	2,7	2,1
Sérine	8,9	8,5	<u>13,9</u>	<u>14,3</u>	<u>13,7</u>
Thréonine	5,6	5,6	5,7	3,1	2,8
Tyrosine	3,5	3,7	<u>10,4</u>	<u>16,7</u>	<u>17,3</u>
Valine	6,0	6,1	4,5	2,3	2,0

(*) dosée sous forme de S-carboxyméthylcystéine

Tous les dosages de ce tableau sont effectués selon la méthode de MOORE et STEIN sur des hydrolysats chlorhydriques de 24 heures.

BUS
LILLE

glycocolle de composition un peu différente de celle des SCMK-RG en général, mais dans les mêmes proportions que des préparations où l'extraction est faite en milieu alcalin selon ALEXANDER et SMITH (116) par exemple (T 59) (colonnes 2, 3 et 4 du tableau XXVI).

Les protéines riches en glycocolle ne sont donc pas des fragments protéiques issus de coupures alcalines des chaînes protéiques.

A ce stade de notre étude il reste à vérifier si seule l'acidité du milieu ne peut pas permettre d'aboutir à de telles protéines. Dans ce but, nous avons soumis la laine vierge à l'action de HCl 6 N à 60°C pendant 15 minutes. Par ce traitement, on extrait une petite quantité de protéines riches en glycocolle et sérine (colonne 1 du tableau XXVI) (T 60). Cependant, là encore on ne peut pas dire que l'acidité du milieu soit la cause de la formation de ces protéines riches en glycocolle puisque de telles protéines peuvent être obtenues à partir des SCMK qui sont en général préparées entièrement en milieu alcalin.

D) ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES SCMK EXTRAITES DU POIL MOHAIR

La fibre Mohair est presque exclusivement constituée d'orthocortex (T 1). L'action du thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 11 et pendant 2 heures à 50°C permet d'extraire 76 % de protéines en poids. Ce taux est donc très voisin du taux d'extraction de l'orthocortex de la laine Mérinos (80,5 %) dans les mêmes conditions expérimentales (Chapitre III).

Les SCMK du Mohair (extraites à 0°C pendant 16 heures) ont été soumises aux différents fractionnements exposés dans le tableau XXII.

La chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 10,4 (conditions analogues à celles de la figure 29) met parfaitement en évidence la fraction riche en soufre. Par contre, ce fraction-

TABLEAU XXVI

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PROTEINES RICHES EN GLYCOCOLLE
(nombre de résidus d'amino-acides pour cent acides aminés).

	EXTRAITS ACIDES (HCl 6 N) 15 min	RG-KERATOSES		SCMK-RG EXTRAITES Δ pH 8 (0°C, urée 4 M) (*)
		EXTRAITS Δ pH 6 (pyridine)	EXTRAITS ALCALINS (NH ₄ OH)	
n° de colonne	1	2	3	4
Alanine	5,5	4,5	3,0	4,7
Arginine	6,0	5,6	6,0	4,5
Ac.aspartique	6,1	3,3	6,5	7,5
Ac.cystéique		8,1	8,3	
1/2 cystine	1,9	-	-	1,3(**)
Ac.glutamique	7,2	3,1	7,4	11,0
Glycocolle	<u>19,4</u>	<u>29,0</u>	<u>19,7</u>	<u>15,2</u>
Histidine	1,7	0,9	1,4	1,5
Isoleucine	2,6	0,9	8,0	2,1
Leucine	6,2	6,4		6,7
Lysine	2,7	0,6	1,1	2,9
Méthionine	0,8	-	-	
Phénylalanine	5,4	6,9	5,3	5,2
Proline	2,3	2,1	7,0	7,6
Sérine	15,1	13,0	12,2	<u>14,6</u>
Thréonine	5,7	2,8	4,8	5,6
Tyrosine	7,0	10,6	5,7(***)	5,4
Valine	4,3	2,1	3,5	4,0

(*) Les détails techniques de la préparation de cette fraction sont exposés au paragraphe T 61)

(**) dosée sous forme de S-carboxyméthylcystéine

(***) Détermination semi-quantitative par la méthode des dinitrophényl-aminoacides. Le taux faible de tyrosine n'est pas significatif, la méthode employée donnant souvent des valeurs très faibles pour cet amino-acide. Les dosages des colonnes 1, 2 et 4 ont été effectués selon la méthode de MOORE et STEIN. Tous ces dosages correspondent à des hydrolysats chlorhydriques de 24 heures.

nement particulièrement bien adapté à la mise en évidence des SCMK-RG montre qu'elles n'existent pas dans le poil Mohair.

L'utilisation du Sephadex G75 et G200 confirme aussi l'absence des SCMK-RG. Elle montre de plus l'identité électrophorétique des SCMK-A Mohair et Mérinos. Il est seulement possible de mettre en évidence par cette méthode l'existence des SCMK-M. Ces conclusions sont confirmées par l'utilisation du DEAE-Sephadex.

E) DISCUSSION

Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'origine des protéines riches en glycofolle : ou bien elles existent dans la laine à l'état natif, ou bien elles proviennent de ruptures de certaines liaisons peptidiques provoquées par les réactifs utilisés à leur préparation. Certains faits expérimentaux semblent en faveur de la seconde hypothèse. Ainsi, ALEXANDER et SMITH (117) montrent qu'au cours de l'extraction des kératines l'action de l'ammoniaque sur les protéines provoque une augmentation très nette du taux de sérine en position N-terminale. On ne peut s'empêcher de remarquer que dans les SCMK-RG qui sont aussi extraites en milieu alcalin, la sérine ainsi que le glycofolle sont en position N-terminale. L'alcalinité du milieu d'extraction est-elle la cause de ce caractère commun qu'est la position N-terminale de la sérine ? Les travaux de PIGACHE et BISERTE (118) apportent encore des arguments qui justifient cette question. Ces auteurs ont en effet montré que par action des bases fortes en solution diluée sur la laine à la température du laboratoire, il y avait solubilisation d'une certaine quantité de protéines avec une libération importante de sérine et de glycofolle, soit sous forme de polypeptides, soit sous forme d'acides-amino libres. Il est donc normal de se demander si la présence des SCMK-RG dans les SCMK n'est pas due

au traitement alcalin. Les résultats du tableau XXV (colonnes 1 et 2) montrent que la majeure partie des protéines extraites par la soude à 50°C ne sont pas particulièrement riches en glycocolle. Seule la dernière fraction éluée sur Sephadex G75 (colonne 3 du tableau XXV) présente les caractères des SCMK-RG (colonne 5 du tableau XXV). Toutefois, s'il y a une parenté entre cette fraction et les SCMK-RG, son volume d'élué sur Sephadex G75, nettement plus important, permet de conclure qu'il s'agit d'une forme dégradée correspondant à des dimensions moléculaires beaucoup plus petites.

La fraction extraite à 0°C (colonne 4 du tableau XXV) se rapproche davantage des SCMK-RG. Ce fait indique que le milieu alcalin permet une extraction préférentielle de cette fraction, qu'on retrouve dans les extraits à 50°C sous une forme dégradée.

Malgré les caractères particuliers de ces extraits sodiques l'extraction de protéines riches en glycocolle ne semble pas dépendre essentiellement de l'alcalinité du milieu d'extraction puisque par action de l'acide chlorhydrique on aboutit aussi à la solubilisation d'une petite quantité de protéines présentant les mêmes caractéristiques de composition. Dans ce cas particulier, l'action de HCl semble très sélective. En effet, les conditions expérimentales choisies sont celles décrites par KASSENBECK (119) et utilisées dans une étude qui met en relation la solubilisation des kératines par l'acide chlorhydrique avec l'aspect microscopique de la fibre. Cet auteur remarque qu'une laine traitée 15 minutes par HCl 6 N à 60°C subit une modification très nette de son aspect microscopique. On remarque la disparition des ciments intercellulaires de la gaine cuticulaire et des résidus nucléiques des cellules paracorticales. Il est donc vraisemblable que les protéines que nous

solubilisons par HCl proviennent de ces régions.

En conclusion, l'extraction des protéines riches en glycolle et en sérine ne peut être liée préférentiellement ni à la basicité ni à l'activité du milieu d'extraction, il est donc normal de se demander si ces fractions n'existent pas naturellement dans la laine Mérinos.

Deux moyens différents peuvent être utilisés pour démontrer cette existence naturelle

- 1) tenter d'extraire au moins partiellement des protéines dans des conditions très douces et dans un milieu constamment voisin de la neutralité.
- 2) Rechercher si les SCMK extraites dans différents types de kératines contiennent aussi des SCMK-RG.

L'action du thioglycolate d'ammonium 0,1 M (ou 0,01 M) à pH 8,0 en milieu urée 4 M et à 0°C (T 61) constitue un traitement extrêmement doux des kératines (T 61). Les quantités de protéines extraites restent cependant très faibles (2 à 3 %). Malgré tout, leur teneur en glycolle et en sérine (colonne 4 du tableau XXVI) quoique moins élevée que celle des SCMK-RG permet de les apparenter à cette dernière fraction. L'électrophorèse sur gel d'amidon permet de confirmer cet apparentement. En effet, la laine traitée une première fois par le thioglycolate d'ammonium est à nouveau traitée par le thioglycolate de potassium dans les conditions habituelles. On obtient alors des SCMK dont la fraction SCMK-RG est incomplète. En effet, certaines bandes caractéristiques des SCMK-RG et qui correspondent aux protéines primitivement extraites sont absentes.

Une confirmation de l'existence naturelle de ces composés riches en glycolle et en sérine est fournie par la comparaison des protéines constitutives des SCMK de la laine Mérinos et du poil Mohair. Les SCMK qui dérivent préférentiellement de l'orthocortex de la laine Mérinos (FRASER et al.)(120),

MOSCHETTO et BISERTE (121) sont électrophorétiquement identiques à celle de la laine Mohair dont le cortex présente presque uniquement le caractère orthocortical. D'autre part, les compositions en amino-acides des deux types de fibre sont presque identiques (CREWETHER et al.) (122).

Il résulte de ces caractères communs que le comportement de l'orthocortex de ces deux fibres vis-à-vis du thioglycolate doit être identique.

L'absence des SCMK-RG dans les SCMK dérivées du poil Mohair confirmée par tous les fractionnements utilisés permet donc d'affirmer que les RG-kératines ne proviennent pas des coupures des chaînes kératiniques par les réactifs utilisés. Le problème de l'origine des SCMK-M est certainement analogue.

Ces fractions existent à l'état naturel dans la fibre, quand elle s'y trouvent, et de plus, elles sont en majeure partie originaires du cortex de la fibre puisqu'on peut aussi les extraire des cellules orthocorticales.

Cette remarque quant à la localisation des SCMK-M et SCMK-RG est très importante car DE DEURWAERDER et al. (123) parviennent aussi à extraire une fraction qui est riche en glycoColle et en tyrosine, elle est de plus, riche en tryptophanne et en phénylalanine. L'extraction est faite sur la laine par une solution de tris(diéthylaminoéthyl) phosphine dans la formamide et les examens en microscopie électronique des fibres ainsi traitées permettent aux auteurs de conclure que les protéines extraites, dérivent des membranes situées entre les cellules cuticulaires. Cependant ces protéines ne représentent vraisemblablement qu'une très faible fraction des SCMKRG qui, nous le répétons sont localisées dans tout le cortex de la fibre.

L'absence des SCMK-RG n'est pas spéciale à la fibre Mohair. La chromatographie sur DEAE-Sephadex, des SCMK dérivées des kératines du cheveu humain montre aussi l'absence de

de ces fractions riches en glycocolle, de plus les SCMK-M sont aussi absentes.

VIII - CONCLUSION

1) L'ensemble des fractionnements utilisés et en particulier l'emploi du DEAE-Sephadex permet de mettre en évidence l'extrême complexité des S-carboxyméthylkératines dérivées de la laine Mérinos. Celles-ci constituent un mélange ne contenant pas moins de trente protéines distinctes. L'utilisation du DEAE-Sephadex montre en particulier que les SCMK-A constituent un groupe de protéines beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait. Celles-ci sont en effet associées à un autre ensemble de protéines (SCMK-M) lui-même très complexe, surtout caractérisé par une forte teneur en sérine.

2) La comparaison des fractionnements chromatographiques réalisés sur les SCMK extraites soit de la laine Mérinos, soit du poil Mohair, montre sans ambiguïté que les SCMK-RG ne proviennent pas de coupures de liaisons peptidiques des chaînes kératiniques par les réactifs utilisés.

Ces protéines ne représentent qu'un pourcentage relativement faible des SCMK (5 à 10 %), mais leur composition en amino-acides est si inhabituelle qu'elle justifie à elle seule des tentatives de purification et d'isolement. L'une d'entre elles a d'ailleurs pu être isolée dans un état de pureté très avancé et est très bien caractérisée par une teneur élevée en glycocolle et en tyrosine.

C H A P I T R E VI

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

A - INTRODUCTION

Le but de nos recherches a été d'isoler un certain nombre de constituants protéiques des kératines en vue de préciser ultérieurement la structure de la laine et de tenter d'expliquer certaines propriétés de cette fibre.

En particulier, les différences de réactivité de l'orthocortex et du paracortex de la fibre vis-à-vis des agents chimiques (acides, bases) ou enzymatiques trouveraient sans doute une explication si on connaissait mieux la structure des protéines constitutives de ces deux fractions morphologiques. Les problèmes à résoudre ont donc été successivement :

- 1) la séparation des constituants morphologiques de la laine.
- 2) l'étude des protéines constitutives des kératines.

Un troisième problème se pose quant à la différenciation précise des protéines ortho- et paracorticales. Il ne peut être résolu qu'en se référant aux données acquises sur les protéines de la laine vierge. Mais l'étude des protéines paracorticales ne peut être abordée directement et nécessiterait des modifications chimiques préalables de ce composant morphologique afin de faciliter la dispersion des protéines. Nous n'avons donc pas abordé ce dernier aspect.

La séparation des cellules ortho et paracorticales est relativement facile. Les critères utilisés pour le contrôle du fractionnement du cortex de la laine et l'étude des protéines dérivées aussi bien des cellules corticales que de la laine vierge ont évolué parallèlement aux progrès techniques réalisés en biochimie analytique. L'utilisation de la DEAE-cellulose nous a montré l'hétérogénéité des protéines extraites. L'application ultérieure de la gel-filtration sur Sephadex nous a permis d'envisager l'isolement des différents groupes de protéines. Le couplage judicieux des deux méthodes chromatographiques nous a conduit à l'isolement de protéines très purifiées. Enfin, l'utilisation de l'électrophorèse en gel d'amidon nous a permis de contrôler efficacement notre plan de fractionnement. De plus, la technique de dosage des amino-acides de MOORE et STEIN a aussi remplacé avantageusement la méthode des dinitrophénylamino-acides, moins précise et moins rapide.

B - SEPARATION DES CONSTITUANTS MORPHOLOGIQUES DE LA LAINE

Nous avons montré que les principales méthodes utilisées pour la séparation de l'orthocortex et du paracortex de la laine modifiaient les protéines que l'on pouvait extraire ultérieurement de ces composants morphologiques.

Nous avons donc précisé les conditions optimales de séparation de l'orthocortex et du paracortex afin de ne pas altérer leur structure protéique. L'utilisation de l'hydrolyse pepsique nous a permis de décrire un protocole de séparation satisfaisant. Nous avons déterminé la composition en amino-acides des hydrolysats à différents stades de l'attaque enzymatique. La composition de ces hydrolysats est sensiblement constante dans le temps, ce qui prouve que la pepsine attaque des régions très précises de la fibre qui sont pauvres en soufre.

Après l'hydrolyse pepsique, la fibre se désagrège en cellules corticales que nous séparons ensuite en cellules ortho- et paracorticales. Les propriétés chimiques des protéines qu'on peut extraire de ces cellules (sous forme de S-carboxyméthyl-kératines) sont identiques à celles des protéines dérivées directement de la laine vierge. On peut donc conclure que la méthode que nous avons mise au point est celle qui à l'heure actuelle respecte le plus l'intégrité des kératines.

C - CLASSIFICATION DES PROTEINES CONSTITUTIVES DES KERATINES.

1) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Les protéines extractibles par le thioglycolate de potassium et modifiées après blocage des groupements thiol libres par l'acide iodoacétique constituent les S-carboxyméthyl-kératines (ou SCMK).

Les SCMK peuvent être divisées en deux classes principales : les SCMK-A pauvres en soufre et les SCMK-B riches en soufre. Nous avons montré de plus l'existence de deux classes mineures, les SCMK-RG et les SCMK-M. Les SCMK-A et les SCMK-B peuvent être séparées par des méthodes actuellement classiques, reposant sur une précipitation aux environ de pH 4. Cette séparation n'est vraiment spécifique que si elle s'effectue en présence de sels neutres à une concentration telle que la force ionique soit comprise entre 0,4 et 0,5 (O'DONNELL et THOMPSON) (124). Certes, ce procédé constitue un fractionnement de base très satisfaisant que nous avons largement utilisé. Mais, les fractions ainsi isolées doivent cependant être purifiées. Différentes techniques ont déjà été décrites par quelques auteurs ; pour notre part, nous nous sommes orientés dès le début de notre travail vers les fractionnements chromatographiques.

Les SCMK-A, qui constituent la fraction pauvre en soufre et qui sont précipitables en milieu acide, ont été purifiées par la méthode de gel-filtration sur Sephadex G75. Nous avons montré que l'on obtenait par cette méthode deux pics chromatographiques parfaitement séparés. Le premier pic majeur contient les SCMK-A et le second, de moindre importance et hétérogène, contient des fractions mineures riches en glyco-colle et en tyrosine. Les mesures que nous avons effectuées par la méthode de gel-filtration montrent que les poids moléculaires des SCMK-A s'échelonnent entre 70.000 et 160.000. Ces valeurs sont en accord avec celles déterminées par O'DONNELL et WOODS (125), mais les valeurs minimales que nous avons trouvées sont supérieures à celles décrites par ces auteurs.

Les SCMK-B constituent la fraction riche en soufre et sont acido-solubles. Nous avons montré qu'elles étaient facilement fractionnées sur Sephadex G200 (voir la figure 32 A). Elles sont constituées de deux fractions principales. Les poids moléculaires que nous avons déterminés par la méthode de gel-filtration sont respectivement de 29.000 et de 16.000. Les valeurs habituellement trouvées pour les SCMK-B sont comprises entre 18.000 et 21.000 (GILLESPIE) (126) et entre 8.000 et 10.000 par la mesure des tensions superficielles (HARRAP) (127). On peut cependant expliquer cette discordance. En effet, nous avons trouvé en plus des deux fractions principales, une petite quantité de protéines dont le poids moléculaire moyen est inférieur à 10.000. Cette observation explique le fait que nous ayons obtenu, pour les fractions principales, des valeurs de poids moléculaire supérieures à celles d'autres auteurs qui ont déterminé des poids moléculaires moyens de fractions non purifiées.

Les SCMK-RG représentent la fraction mineure obtenue par chromatographie sur Sephadex G75 des SCMK-A (voir plus haut). Elles constituent un groupe de protéines caractérisées par une très forte teneur en glyco-colle, en tyrosine et en sérine. Ces trois amino-acides représentent 50 à 60 p. 100 du nombre de résidus d' amino-acides. A la suite de nos travaux, l'isolement et la caractérisation de cette fraction ont été confirmés par les recherches australiennes de CREWTHOR et al. (128) en 1965. Comme les SCMK totales, mais en milieu de faible force ionique, les SCMK-RG peuvent se subdiviser en deux sous-fractions par précipitation en milieu acide. La fraction acido-soluble a une teneur en soufre un peu plus élevée que celle de la fraction précipitable. Mais, les teneurs en soufre de ces deux sous-fractions restent faibles et seulement un peu plus élevées que celle des SCMK-A.

Les SCMK-M que nous avons mises en évidence par chromatographie sur DEAE-Sephadex à partir des SCMK ou des SCMK-A, constituent un groupe de protéines très complexe. Ces protéines sont surtout très riches en sérine et, à l'inverse des SCMK-RG, leur teneur en tyrosine est assez faible. La chromatographie sur DEAE-Sephadex montre que l'on peut distinguer, comme pour les SCMK-RG, deux fractions dont les teneurs en soufre cystinique, quoique faibles, sont différentes. (voir le tableau XXIX).

Nous avons pu montrer que les deux groupes mineurs (SCMK-RG et SCMK-M), qui représentent chacun 5 à 10 p. 100 du poids des SCMK-A, existent à l'état natif dans les kératines. Ils ne proviennent pas de coupures des chaînes peptidiques. Par contre, on ne les trouve pas en égale proportion dans les

diverses fibres kératiniques : les SCM-K-RG sont absentes dans la fibre Mohair ; les SCM-K-RG et les SCM-K-M n'ont pu être mises en évidence dans le cheveu humain.

La chromatographie sur Sephadex G200 dans les conditions que nous avons définies (voir la figure 28 et le tableau XXII) confirme l'ensemble de la classification que nous venons de proposer.

2) ETUDE ELECTROPHORETIQUE

La classification des kératines en 4 groupes que nous venons de définir par des méthodes chromatographiques concorde parfaitement avec les études électrophorétiques que nous avons effectuées..L'utilisation de l'électrophorèse en gel d'amidon nous a permis une étude comparée de ces quatre groupes. Tout d'abord, chacun d'eux est constitué d'un certain nombre de protéines révélées sur les électrophorégrammes. L'ensemble des quatre groupes correspond au moins à 30 protéines nettement différenciées. Nous avons défini chacune de ces protéines par une mobilité électrophorétique relative.

Malgré leur homogénéité en électrophorèse libre et en ultracentrifugation, les SCM-K-A se révèlent en électrophorèse en gel d'amidon comme un groupe encore complexe. Il est constitué de huit protéines nettement individualisées et d'un groupe révélé d'une façon très diffuse. Les mobilités de ces protéines sont assez faibles et les SCM-K-A se révèlent d'autre part, sous la forme d'un système compact de bandes.

Les SCM-K-B sont au contraire très rapides et sont révélées sous forme de deux bandes assez étalées. La plus rapide contient au moins deux constituants de mobilité très voisine.

Les SCMK-RG ont des mobilités voisines des SCMK-B mais sont composées de bandes fines et intensément colorées.

Quant aux SCMK-M, elles migrent en partie comme les SCMK-A mais la plupart des constituants se trouvent répartis dans la région médiane de l'électrophorégramme. L'ensemble de tous ces résultats a été consigné sous forme d'un tableau comparatif (voir tableau XXIII).

D - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SCMK

Les différents groupes identifiés ci-dessus ont été caractérisés par leur composition en amino-acides. Le problème de l'isolement des protéines constitutives de ces groupes ne peut être résolu dans son ensemble dans le cadre de notre travail.

Nous avons malgré tout essayé de préciser la composition en amino-acides de certains composants. L'isolement de protéines très purifiées ne peut être réalisé que par le couplage des méthodes chromatographiques. Ce problème n'a été abordé que par quelques spécialistes de la laine. Par exemple, O'DONNELL et THOMPSON (129) ont proposé un sous-fractionnement des SCMK-A, (GILLESPIE) (130) a proposé une méthode de séparation des SCMK-B. Dans le premier cas, deux protéines ont été isolées, qui diffèrent fortement dans leur composition en amino-acides. Dans le second cas, le résultat est plus douteux.

Nous avons donc abordé le problème du fractionnement des SCMK-B avec les méthodes chromatographiques que nous avons mises au point. Ces protéines sont facilement fractionnées sur Sephadex G200 (voir la figure 32 A). Une purification ultérieure peut être obtenue par couplage avec une chromatographie sur DEAE-cellulose ou sur DEAE-Sephadex. Nous sommes parvenus à isoler une des protéines constitutives des SCMK-B dans un

état de pureté tel qu'on ne révèle qu'une seule bande majeure en électrophorèse sur gel d'amidon. La composition en amino-acides a été déterminée. Cette fraction a une teneur assez élevée en cystine et en proline.

De même le couplage des chromatographies sur DEAE-cellulose et sur DEAE-Sephadex nous a permis d'isoler une SCMK-RG dont nous avons également déterminé la composition en amino-acides. Comme le groupe dont elle dérive, cette protéine a une haute teneur en glyco-colle, en tyrosine et en sérine.

En conclusion, notre contribution à l'étude des kératines de la laine nous a permis de définir quatre groupes distincts de protéines. Nous avons mis au point plusieurs méthodes d'isolement et de caractérisation des S-carboxyméthyl-kératines. Deux protéines ont pu être isolées dans un état de pureté électrophorétique satisfaisant et leur composition en amino-acides a été déterminée.

L'étude de ces protéines nous a permis de montrer que la méthode de séparation de la laine en ses composants morphologiques par hydrolyse pepsique n'altère pas les protéines constitutives de ces fractions.

L'ensemble de ce travail constitue une étape indispensable pour entreprendre des études plus poussées sur les diverses kératines.

C H A P I T R E VII

EXPOSE DES TECHNIQUES

I - SUBSTRATS ET REACTIFS

A - LAINE MERINOS (T 1) (*)

1) Origine

La laine utilisée est constituée par la toison complète d'un mouton Mérinos élevé en Australie. L'animal est élevé dans les conditions atmosphériques et alimentaires constantes pour obtenir toujours le même type de laine. Nous avons utilisé deux tontes SW 286 et SW 294 aimablement fournies par Messieurs les Docteurs ROBERTS N.F. et JAMES J.F. du C.S.I.R.O.

Au début de notre étude nous avons utilisé occasionnellement une laine, lavée industriellement mais dans des conditions douces, et fournie par le Centre Textile de Contrôle et de Recherche Scientifique de Roubaix sous forme de ruban peigné. L'utilisation de cette laine est signalée dans le texte pour les abréviations (R.P.)

2) Traitement de la laine en toison

La toison est déployée. Les pointes des fibres, qui représentent la partie la plus externe de la toison, sont coupées. Les débris végétaux sont éliminés. La laine est ensuite traitée 48 h à l'éther de pétrole dans un extracteur de Soxhlet pour extraire le suint. Elle est ensuite séchée à l'air puis lavée à l'eau distillée pour dissoudre les sels minéraux. La laine essorée est ensuite séchée sous forte ventilation à l'étuve à 37-40°C.

(*) Les indications T, entre parenthèses indiquent les différents paragraphes relatifs aux diverses techniques utilisées et correspondent aux références indiquées dans l'exposé de notre travail.

B - FIBRE MOHAIR (T 2)

Le Mohair, poil de chèvre Angora, nous a été fourni en toison et en ruban peigné par le C.T.C.R.S. de Roubaix. Il provenait du CAP.

C - ENZYMES (T 3)

1) Pepsine

La pepsine employée est cristallisée deux fois (Worthington Biochemical Corp. Lot 646).

2) Trypsine

La trypsine utilisée est cristallisée une fois en présence de $Mg SO_4$ (Seravac Laboratories, CAPE TOWN, SOUTH AFRICA)

D - REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES (T 4)

Tous les réactifs et produits chimiques utilisés sont à l'état de pureté pour analyse ou sont amenés à cet état par purification au laboratoire.

E - AGENTS DE CHROMATOGRAPHIE (T 5)

Echangeurs d'ions

- Diéthylaminoéthylcellulose ou DEAE-cellulose POWDER DE 50 "WHATMAN".

- DEAE-SEPHADEX A 50 "MEDIUM"

3,5 ± 0,5 mEq/g, granulation : 100 - 270 mesh. Volume de gel par gramme sec : 10 - 15 ml (dans un tampon phosphate 0,2 M de pH 7). ("PHARMACIA" UPPSALA, SUEDE).

- "Cation Exchange Resin" DOWEX 50 x 4 ("BIO-RAD Laboratories", U.S.A.)

Agents de gel-filtration

- SEPHADEX G75

Prise d'eau : 7,5 ± 0,5 g/g, granulation : 40-120 µ.

Volume de gel par gramme sec : 12-15 ml.

- SEPHADEX G100

Prise d'eau : 10 ± 1 g/g, granulation : 40-120 μ - Volume de gel par gramme sec : 15-20 ml.

- SEPHADEX G200

Prise d'eau 20 ± 2 g/g, granulation 40-120 μ - volume de gel par gramme sec : 30-40 ml.

Le Sephadex sous toutes ses formes est fourni par "PHARMACIA" (UPPSALA, SUEDE).

II - METHODES GENERALES D'ANALYSE

A - ANALYSE DES ACIDES AMINES PAR LA METHODE DE PIEZ ET MORRIS (T 6)

1) Généralités

La méthode de dosage des acides aminés donnant à l'heure actuelle les résultats les plus satisfaisants est celle décrite par SPACKMAN, STEIN et MOORE (131). Nous utilisons une variante de cette dernière décrite par PIEZ et MORRIS (132) et adaptée à l'appareillage utilisé dans le laboratoire (TECHNICON) par DAUTREVAUX (133). Le mode opératoire comprend schématiquement deux parties : la séparation chromatographique des acides aminés et leur dosage automatique.

2) Séparation chromatographique (T 7)

La chromatographie est réalisée sur une colonne de résine sulfonée (DOWEX 50 X 12) d'une longueur de 133 cm et d'un diamètre de 0,9 cm. Ce type de résine permet la séparation de tous les acides aminés habituels en une seule opération, mais il nécessite une température d'élution de 60°C et un calibrage parfait de la résine (22 microns). L'élution des amino-acides fixés au sommet de la colonne est réalisée par un tampon citrate de sodium - acide citrique de pH et de molarité croissants : le gradient continu est obtenu au moyen

d'un "Varigrad" (PETERSON et SOBER) (134) permettant le mélange progressif au cours de la chromatographie, du contenu de chacune des 9 cellules de l'appareil. La composition du tampon de chaque cellule (Tableau XXVII) conditionne l'évolution du pH et de la molarité du tampon injecté au sommet de la résine.

L'injection au sommet de la colonne est réalisée au moyen d'une pompe (*) permettant un débit constant de 30 ml/h sous une pression de 1 à 3 kg/cm selon la molarité du tampon. La durée d'une chromatographie est de 21 heures. Après ce laps de temps et pour éviter toute perte d'acides aminés on continue à injecter pendant 1 heure supplémentaire une solution de citrate trisodique 2,4 N. La colonne est ensuite directement régénérée et équilibrée par un tampon citrate de sodium-acide citrique 0,25 M de pH 2,91. Toutes ces opérations sont effectuées automatiquement par l'ouverture de vannes électromagnétiques commandées par un programmeur électronique.

3) Dosage (T 8)

Dans cette deuxième partie du processus opératoire d'ailleurs simultanée à la chromatographie, une partie aliquote de l'éluat (0,32 ml/minute) est prélevée et mélangée

(*) Minipump (MILTON ROY COMPANY) débit 0 à 114 ml/h.

TABLEAU XXVII

COMPOSITION DES TAMPONS DU "VARIGRAD"

(PIEZ et MORRIS) (135)

Cellule n°	Tampon pH 2,91	Citrate 2,4 N	H ₂ O	pH	Norma- lité en (Na ⁺)
1	75 ml	-	-	2,91	0,25
2	75 ml	-	-	2,91	0,25
3	75 ml	-	-	2,91	0,25
4	70 ml	5 ml	-	3,30	0,295
5	50 ml	24 ml	-	4,30	0,70
6	40 ml	19 ml	15 ml	4,30	0,556
7	30 ml	10 ml	34 ml	4,30	0,315
8	5 ml	52 ml	15 ml	5,90	1,26
9	-	71 ml	-	7,26	2,40

I : Tampon 0,25 M, pH 2,91 :
595,2 g citrate trisodique 5,5 H₂O.
1624 g acide citrique H₂O

1 ml d'acide n-caprylique

H₂O q.s.p. 20 litres

Ajuster à pH 2,91 avec de l'acide citrique, le pH de la solution obtenue étant généralement trop élevé.

Ce tampon est privé d'ammoniaque par passage sur une colonne d'Amberlite IR 120 sous forme Na⁺ équilibrée à pH 2,91.

Avant usage on ajoute 2,70 p. 1000 d'une solution de "Brij 35", agent tensioactif (50 g dissous à chaud dans dans 150 ml d'eau et 5 p. 100 de thiodiglycol (milieu réducteur, pour isoler le mélange cystine-cystéine sous forme de cystéine (MOORE et STEIN) (136)

II : Citrate de Na 2,4 N

au réactif à la ninhydrine (*). La colonne liquidienne ainsi formée est d'autre part fragmentée par injection de bulles d'azote (0,10 ml/minute) et le tout est amené dans un bain-marie à 95°C où le mélange circule pendant 20 minutes. L'injection de l'éluat et de l'azote est réalisée au moyen de la pompe proportionnante à galets de l'Autoanalyseur. Le réactif

(*) Le réactif à la ninhydrine est obtenu en mélangeant les deux solutions suivantes :

1^o) Une solution de 11 g de ninhydrine et de 1,65 g d'hydrindantine dans 412 ml d'ester monoéthylique du glycol ; cette solution est préparée sous atmosphère d'azote.

2^o) Un mélange de 2100 ml d'ester monoéthylique du glycol, de 3075 ml d'eau bidistillée, de 2 ml d'une solution de complexon à 2,5 p. 100 et de 420 ml de tampon acétate de sodium-acide acétique 4 M de pH 5,5 qui a été conservé 12 à 24 h sous atmosphère d'azote ; l'ester monoéthylique du glycol utilisé est préalablement distillé sur couple Cu-Zn (EUSSEON et al.) (137) on s'assure de plus de l'absence de peroxyde par action sur l'iodure de potassium.

Ce réactif est étalonné avant chaque dosage par rapport à une solution 0,5 mM de leucine. Les densités optiques lues pour cette solution par chacun des 3 colorimètres de l'appareil utilisé (TECHNICON) sont d'environ 0,400 pour le colorimètre n^o 1, 0,800 pour le colorimètre n^o 2 et 0,190 pour le colorimètre n^o 3 (voir plus loin). Ces densités optiques sont ramenées à des valeurs fixées arbitrairement et communes à tous les dosages (0,450 - 0,900 - 0,200).

à la ninhydrine est au contraire injecté au moyen d'une "Minipump" (débit : 144 ml/h). Le schéma d'ensemble de l'appareil est illustré par la figure 34.

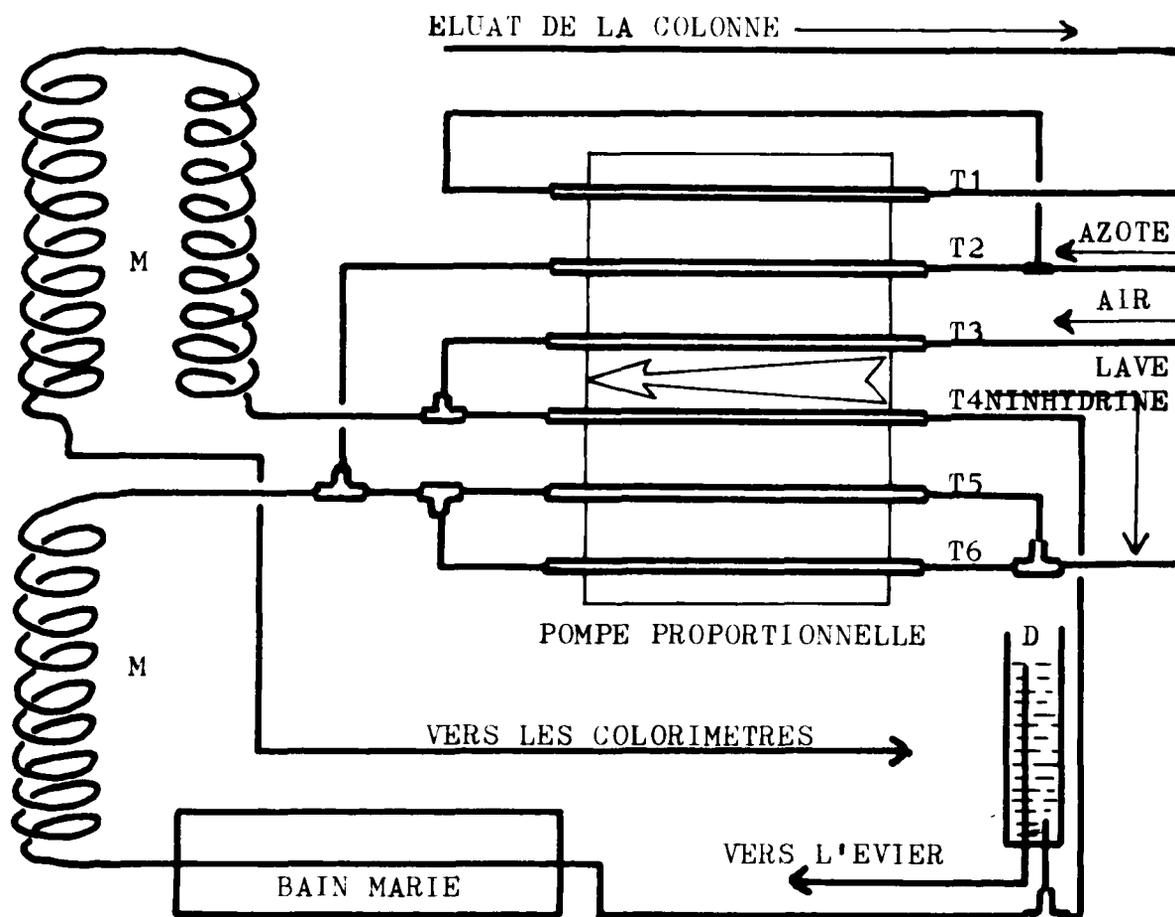
Au sortir du bain-marie on reprend au moyen de la pompe proportionnelle une partie du mélange réactionnel (2,90 ml/minute) à laquelle on injecte de l'air, de façon à réoxyder l'hydrindantine résiduelle en ninhydrine. Finalement, le mélange est conduit à une série de trois colorimètres permettant la lecture à deux longueurs d'onde et deux sensibilités différentes. Deux des colorimètres équipés de filtres à 573 et à 571 m μ permettent la lecture de la coloration bleue-violette à deux sensibilités différentes (cuves de 4 et de 8 mm d'épaisseur) et le troisième équipé d'un filtre à 441 m μ permet la lecture de la coloration jaune donnée par la proline et l'hydroxyproline. Les densités optiques indiquées par ces colorimètres sont simultanément inscrites sur le papier d'un enregistreur à plusieurs canaux sous la forme de trois courbes différentes (Figure 35).

4) Interprétation des résultats (T 9)

Le calcul des quantités d'acides aminés mises en jeu dans le dosage est réalisé à partir des courbes d'élu-tion : il consiste à mesurer la surface de chaque pic de la courbe en l'assimilant à un triangle ($S = H \times \underline{B}$). Des essais préliminaires effectués sur des mélanges témoins d'²amino-acides en concentration équimoléculaire permettent de connaître le rendement colorimétrique exact de la réaction de la ninhydrine avec chaque amino-acide.

Les surfaces de chaque pic d'acide-amino sont ensuite corrigées en fonction de ces coefficients colorimétriques.

D'autre part, les hydrolyses des protéines sont en général effectuées pendant deux durées différentes (24 h et 72 h). Ces deux temps différents permettent de tenir compte de la destruc-



BUS
LILLE

FIGURE 34

SCHEMA D'ENSEMBLE DU DISPOSITIF DE DOSAGE COLORIMETRIQUE
DES AMINO-ACIDES

M = mélangeurs

T = tubes de la pompe
proportionnelle

- : T 1 : débit 0,32 ml/heure
- T 2 : débit 0,42 ml/heure
- T 3 : débit 1,20 ml/heure
- T 4 : débit 2,90 ml/heure
- T 5 et T 6 : débit 2,00 ml/heure



FIGURE 35

CHROMATOGRAPHIE D'UN HYDROLYSAT CHLORHYDRIQUE
DE PROTEINE

Courbe supérieure : colorimétrie à 571 m μ , cuve de 8 mm.

Courbe médiane : colorimétrie à 573 m μ , cuve de 4 mm.

Courbe inférieure : colorimétrie à 441 m μ , cuve de 4 mm.

destruction de certains acides aminés au cours de l'hydrolyse (tyrosine, sérine, thréonine, acides aspartique et glutamique).

On peut ensuite extrapoler à la valeur A_0 , représentant la teneur de la protéine en acide aminé au temps 0 de l'hydrolyse, les valeurs A_1 et A_2 qui sont les résultats du dosage après des durées d'hydrolyse t_1 et t_2 . Pour ce calcul on peut appliquer la formule de HIRS, STEIN et MOORE (138) qui suppose une destruction des acides aminés par une réaction d'ordre 1

$$\log A_0 = \frac{t_2}{t_2 - t_1} \times \log A_1 - \frac{t_1}{t_2 - t_1} \times \log A_2$$

Dans de nombreux cas la formule

$$A_0 = \frac{t_2}{t_2 - t_1} \times A_1 - \frac{t_1}{t_2 - t_1} \times A_2$$

donne des résultats sensiblement identiques.

5) Conditions d'hydrolyse des protéines (T 10)

Les hydrolyses sont réalisées de façon à éviter toute oxydation des amino-acides et toute perte par réactions secondaires au cours de l'élimination de l'acide chlorhydrique.

Dans le cas de la S-carboxyméthylcystéine par exemple, si on n'a pas pris la précaution de dégazer soigneusement sous vide avant l'hydrolyse, on peut enregistrer des pertes allant jusque 50 p. 100 (COLEY, STEIN et MOORE) (139). Apparemment, le sulfoxyde formé par oxydation est instable dans HCl chaud comme dans le cas du sulfoxyde de la S-méthylcystéine.

D'autre part, si on évapore les hydrolysats par dessiccation sous vide sur NaOH on enregistre souvent une diminution du taux de sérine. IKAWA et SNEEL (140) expliquent ce déficit en sérine par la formation d'esters du type O (gamma-glutamyl)-sérine. Pour éviter cet inconvénient, il faut procéder à une

évaporation rapide et en milieu de faible concentration en HCl.

Ces remarques nous ont amené à utiliser le protocole d'hydrolyse suivant :

Une quantité voisine de 4 mg de protéine, pesée au 1/100 de mg, est introduite dans un micro-bécher de 0,3 ml environ et de forme haute. On laisse tomber ce dernier dans un tube de verre pyrex (épais) haut de 25 cm et d'un diamètre de 1,5 cm, fermé à la base et contenant 4 ml d'une solution aqueuse de HCl à 50 p. 100 (V/V). Cette solution est préparée extemporanément à partir d'acide chlorhydrique Merck et d'eau bidistillée. Le tube est ensuite épaissi au chalumeau au 2/3 de sa hauteur et l'extrémité en est brûlée pour enlever le mordant du verre. Après refroidissement complet, on congèle dans un mélange neige carbonique-acétone et on dégaze sous vide (pompe à vide). Le dégazage doit être poursuivi plusieurs minutes après la décongélation. On scelle ensuite le tube au chalumeau en maintenant le vide. L'hydrolyse dure ensuite 24 ou 72 heures à la température constante de 110°C. Après refroidissement rapide et ouverture du tube à hydrolyse, l'hydrolysate est transvasé quantitativement dans un flacon à plasma de 500 ml en effectuant de nombreux rinçages à l'eau distillée. Le volume final est amené à 100-150 ml. Après congélation à - 20°C le contenu du flacon est lyophilisé puis repris par 4 ml d'une solution millimolaire de Norleucine. La présence de Norleucine permet de connaître exactement la quantité d'hydrolysate déposée sur la colonne de résine. Dans le cas des glycoprotéines la solution chlorhydrique utilisée contient environ 0,03 p. 100 de trichlorure de titane (p/V) afin d'éviter la formation de dépôts charbonneux pendant l'hydrolyse.

B - DOSAGE DES ACIDES AMINES TOTAUX PAR LA METHODE DE LEVY (T 11)

1) Principe de la méthode et généralités

(141)

La dinitrophénylation est une méthode introduite par SANGER (142) en 1945 pour l'étude de la structure des protéines. Le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) se fixe facilement, à la température du laboratoire et en milieu légèrement alcalin, sur les groupes α -aminés libres d'un acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine. Au cours de cette condensation, le radical dinitrophényle se fixe aussi sur les groupements thiol de la cystéine et phénol de la tyrosine, les groupes ω -aminés des acides diamminés ainsi que sur le noyau imidazole de l'histidine. L'arginine et les amides des acides dicarboxyliques ne donnent qu'un dérivé mono-dinitrophénylé sur le groupe α -aminé.

Les dinitrophénylamino-acides (DNP-amino-acides) se classent en deux groupes suivant leur solubilité : le groupe des éthéro-solubles et le groupe des hydrosolubles. Le groupe des hydrosolubles englobe les dérivés suivants : α -mono-DNP-arginine, α -mono-DNP-histidine et acide DNP-cystéique . Le groupe des DNP-éthérosolubles englobe tous les autres dérivés y compris la S-carboxyméthyl-DNP-cystéine que l'on rencontre lorsque l'on traite des protéines S-carboxyméthylées après réduction (voir la revue générale de BISERTE et al.) (143). Un exposé pratique de la méthode a récemment été fait par BISERTE et MOSCHETTO (144). L'hydrolyse totale de la protéine est faite à l'aide HCl 6 N, après dégazage sous vide. Les hydrolysats étendus d'eau sont lyophilisés. L'hydrolysats lyophilisé correspondant à 10 mg de protéine est repris dans de l'eau distillée (10 ml).

La condensation des amino-acides avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène a lieu à 40°C et à pH constant de 9.

Après refroidissement et élimination de l'excès de FDNB par extraction à l'éther, une partie des DNP-amino-acides est

extraite à l'éther après acidification du milieu. Cette extraction est complétée à l'aide d'acétate d'éthyle. Les extraits réunis constituent la phase étherée qui contient tous les amino-acides à l'exception de l'acide DNP-cystéique, de la DNP-arginine et de l' α -mono-DNP-histidine.

Ces dérivés (DNP-hydrosolubles) restent dans la phase aqueuse et sont extraits par un mélange acétate d'éthyle et n-butanol. Les deux phases "éther" et "butanol" sont évaporées séparément et le dinitrophénol qui les souille est éliminé par sublimation.

Les DNP-amino-acides sont ensuite repris par de l'acétone et déposés sur papier Whatman n° 1 en vue de leur séparation chromatographique. Les DNP-éthérosolubles subissent une chromatographie bidimensionnelle dans le système solvant toluène-phosphate de BISERTE et OSTEUX (145).

Les DNP hydrosolubles sont chromatographiés en une seule dimension dans le premier solvant de ce système.

Pour le dosage colorimétrique, les taches colorées en jaune sont éluées avec une solution de bicarbonate à 2 p. 100 et les lectures sont faites à 360 m μ sauf pour la DNP-proline.(385 m μ).

La condensation des acides aminés avec le 2-4 dinitrofluorobenzène n'étant pas totale et variant avec chaque acide aminé, il y a lieu de multiplier les densités optiques obtenues par des facteurs de correction calculés par LEVY (146). Les résultats sont exprimés en nombre de résidus d'amino-acides pour 100 acides aminés.

C - DOSAGE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX SELON LA METHODE DE SANGER (147) (T 12)

La condensation de la protéine avec le fluorodinitrobenzène se fait à 25°C pendant 24 h en milieu tamponné par du

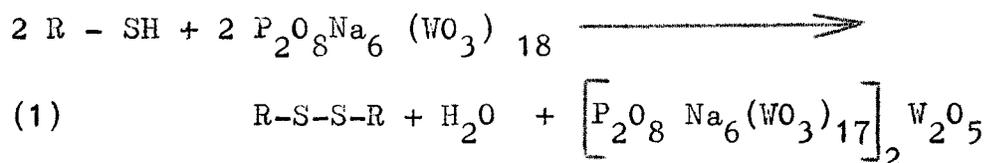
bicarbonate de sodium. Le milieu contient en plus du chlorhy-
de guanidine (PHILLIPS) (148).

La dinitrophényl-protéine ainsi obtenue, généralement
insoluble, est hydrolysée par HCl 5,6 N pendant 16 h à 110°C.
Les DNP-amino-acides terminaux sont extraits sélectivement
identifiés par chromatographie et dosés selon le protocole
exposé précédemment.

D - DOSAGE DU SOUFRE THIOL ET DISULFURE (SHINOHARA) (149) (T 13)

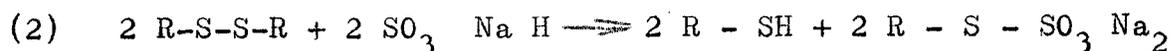
1) Principe

Le dosage de la cystéine est fondé sur l'oxydation du
groupement thiol qui s'accompagne de la formation de 1 molécule
de cystine pour 2 molécules de cystéine. Cette oxydation est
faite par un excès de phospho-18-tungstate de sodium ($P_2O_8Na_6$
(WO_3)₁₈, 22 H₂O) qui est réduit quantitativement avec forma-
tion d'un composé bleu intense selon la réaction.



L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle au
nombre de groupements thiols oxydés.

Le dosage de la cystine nécessite sa réduction préalable
en cystéine par action du bisulfite de sodium



Le mode opératoire que nous décrivons permet donc de
doser à la fois la cystéine présente initialement dans la laine
et celle apparue par réduction de la cystine à l'aide du
bisulfite de sodium.

2) Mode opératoire

a) Pour avoir une réduction complète de la cystine, il est nécessaire qu'elle soit à l'état libre ou engagée dans des oligopeptides à cystine.

Dans ce but des échantillons de 100 mg de laine sont hydrolysés partiellement par 20 ml de HCl 5 N à l'ébullition à reflux pendant 6 heures. L'hydrolysate amené à 100 ml avec de l'eau distillée est filtré.

b) La cystine est ensuite dosée sur des prises d'essais de 5 ml. S'il est nécessaire de faire des prises d'essais inférieures ou supérieures, on ajoutera respectivement une quantité correspondante de HCl N/1 ou de NaOH N/1 pour que celles-ci contiennent toujours 0,005 mEq de HCl. La constance du pH est en effet indispensable pour avoir un développement régulier de la coloration et surtout une reproductibilité parfaite des densités optiques données par les essais à blanc. Le pH final au moment du développement de la coloration doit être compris entre 5 et 5,1. Après dosage le pH est d'ailleurs contrôlé et les essais dont le pH s'écarte de ces valeurs sont recommencés.

c) Le milieu est tamponné par 20 ml de tampon acétate de sodium 0,6 M -acide acétique 0,07 M.

d) La réduction de la cystine en cystéine est faite au moyen de 3 ml d'une solution de bisulfite de sodium préparée extemporanément par dilution de 40 ml d'une solution à 30°B à 100 ml avec de l'eau distillée. On agite et attend quelques minutes.

e) On ajoute alors 4 ml de réactif phosphotungstique (solution aqueuse de phosphotungstate de sodium à 95 g/l), agite et amène à 50 ml. On laisse la coloration se développer

à l'obscurité pendant 20 minutes à la température du laboratoire. Les lectures de densité optique sont ensuite faites à 650 m μ .

f) Pour tenir compte de la coloration très faible produite par les réducteurs autres que la cystéine, on fait parallèlement des essais à blanc. On procède comme pour le dosage mais, pour éviter que la cystéine ne réagisse avec le réactif phosphotungstique, celle-ci est complexée par formation d'un mercaptide qui ne réagit pas.



Ce mercaptide est formé en ajoutant avant le réactif phosphotungstique 3 ml d'une solution 0,1 M de chlorure mercurique. On attend 3 minutes avant d'ajouter le réactif phosphotungstique.

g) Les teneurs en cystine sont déterminées par référence à une courbe étalon établie avec des solutions de cystine de concentration connue. Dans la pratique, les résultats sont exprimés en g de soufre pour 100 g de substance.

E - DOSAGE DE L'AZOTE PROTEIQUE (T 14)

Les teneurs en azote sont déterminées par micro-kjeldahl. La protéine (20 mg) est minéralisée par 10 ml d'acide sulfurique concentré pur, à l'ébullition pendant 24 heures en présence d'une goutte de mercure, de 250 mg de catalyseur (Sélénite de sodium : 10 g ; sulfate de cuivre : 10 g ; sulfate de potassium : 80 mg).

Une minéralisation de 24 heures est nécessaire pour estimer tout l'azote protéique des kératines.

Après minéralisation et refroidissement, on complète à 50 ml avec de l'eau distillée. Sur une prise d'essai de 20 ml, après addition de 20 ml de lessive de potasse à 1000 g par

litre, l'ammoniaque est entraînée à la vapeur. Le distillat est reçu dans 20 ml de H_2SO_4 N/50 et l'ammoniaque est titrée en retour par KOH N/50 en présence d'alizarine sulfonate de sodium comme indicateur de virage.

F - ELECTROPHORESE EN VEINE LIQUIDE (T 15)

Nous avons utilisé la méthode décrite par TISELIUS (150) et un appareillage "AMINCO" (Société Radiophon, Paris).

1) Principe

A la limite de deux liquides, l'un constitué d'un tampon, l'autre d'une solution de protéines dans ce tampon, on forme une "frontière". Cette frontière est constituée par une surface de séparation parfaitement plane entre la solution tampon et la solution de protéine. Cette frontière correspond à une variation brusque de l'indice de réfraction (en réalité cette variation est continue à cause des phénomènes de diffusion). Cette variation d'indice est mise à profit dans la méthode de TISELIUS pour visualiser à l'aide d'un système optique complexe la frontière sous forme d'un pic électrophorétique.

Si on établit dans la colonne liquide un champ électrique, les molécules protéiques chargées électriquement vont se déplacer provoquant une migration de la frontière.

Le déplacement de cette frontière permet de calculer la mobilité électrophorétique d'une protéine.

Rappelons que l'on appelle mobilité électrophorétique d'une particule chargée électriquement, le rapport $u = \frac{v}{E}$ où v désigne la vitesse de la particule et E le champ électrique. En remplaçant par sa valeur $E = \frac{V}{d}$ où V exprime la d.d.p. aux électrodes et d la distance entre ces dernières, on obtient :

$$u = v \times \frac{d}{V}$$

v = en cm/sec.

d = en cm

V = en volts

d'où l'expression de u en $\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$

Dans la pratique, et compte tenu des caractéristiques de l'appareil utilisé, la mobilité d'une protéine sera calculée par la relation

$$u = \frac{\Delta x. k. s}{t.i}$$

u = la mobilité en cm^2 par volt et par seconde ($\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$)

Δx = le déplacement de la frontière en cm dans la cellule.

k = la conductibilité spécifique en mho/cm à 0°C.

s = la surface de la section principale d'une branche de la cellule en cm^2 .

t = le temps en secondes pour produire le déplacement Δx .

i = le courant en ampères.

G - ELECTROCHROMATOGRAPHIE : COUPLAGE ELECTROPHORESE A pH 3,9 + CHROMATOGRAPHIE (T 16)

Les conditions expérimentales sont celles décrites par BISERTE et al. (151)

1) Première étape :

Electrophorèse à pH 3,9 sur papier Whatman n° 3 (57 cm x 47 cm) sous 600 volts pendant 7 à 8 heures ou 450 volts pendant 15 heures dans le sens de la plus grande dimension de la feuille. Le dépôt est effectué dans un coin de la feuille à 20 cm du côté anodique et 10 cm de l'autre bord.

Le tampon de pH 3,9 a la composition suivante : pyridine-acide acétique-eau (3 : 10 : 487).

2) Deuxième étape

Après séchage sous une hotte par ventilation d'air froid, la chromatographie descendante est réalisée perpendiculairement au sens de migration électrophorétique dans le système classique n-butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) pendant 24 à 30 heures.

3) Révélation

La révélation des peptides est faite à l'aide d'une solution de ninhydrine à 1 p. 100 dans de l'acétone aqueuse à 90 p. 100. Le développement de la coloration se fait par chauffage durant une période de 15 à 30 minutes à 80°C sous surveillance pour éviter l'apparition d'un fond violacé.

Les électrochromatogrammes sont conservés après pulvérisation du réactif de Kawereau (1 ml d'une solution aqueuse saturée de nitrate de cuivre additionné de 0,2 ml d'acide nitrique à 10 p. 100 (vol/vol) et dilué dans un ballon de 100 ml par de l'éthanol). Après pulvérisation les taches violettes prennent une coloration rouge, stable à l'obscurité.

H - ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON (T 17)

Les électrophorèses en gel d'amidon horizontal (SMITHIES) (152) sont faites en utilisant le système tampon discontinu Tris-borate de POULIK (153)

Dans le tampon servant à faire le gel, on utilise de l'urée 8 M comme agent de désagrégation (POULIK) (154) (*)

(*) Formule du tampon Tris-borate de pH 8,6 (POULIK) (156)
Tampon du gel :

Tris-hydroxyméthyl-amino-méthane 0,076 M (9,196 g), acide citrique 0,005 M (1,051 g), Eau distillée q.s.p. 1000 ml,
Tampon des électrodes :

Acide borique 0,3 M (18,552 g), soude 0,05 M (2 g), Eau distillée q.s.p. 1000 ml.

L'amidon de pomme de terre (BENDER et HOBEIN) est hydrolysé partiellement par l'acide chlorhydrique à 3 p. 100 dans l'acétone pendant 85 minutes. Après lavage à l'eau pour éliminer les sels minéraux, l'amidon est déshydraté à l'acétone et séché à l'étuve à 37°C. 20 g d'amidon hydrolysé sont mis en suspension dans 100 ml de tampon Tris-citrique.

On chauffe 5,5 minutes à 85°C et on ajoute 80 g d'urée. Le chauffage à 85°C est encore poursuivi pendant 3 minutes sous agitation à l'aide d'un agitateur en verre. Après ce temps le gel qui est parfaitement liquide est dégazé sous vide. Il est coulé chaud dans des cuves à électrophorèse à deux compartiments (200 mm x 22 mm x 6 mm).

Les gels ne sont utilisés qu'après une prise de 24 heures à la température du laboratoire. Les protéines sont appliquées par insertion dans le gel de bandes de papier Whatman n° 3 M M imprégnées d'une solution de protéines à la concentration maximale de 1 p. 100 (THOMPSON et O'DONNELL) (155).

Les électrophorèses sont réalisées dans des enceintes en PLEXIGLAS maintenues à la température constante de 4°C. La tension appliquée est calculée pour avoir une différence de potentiel dans le gel d'environ 16 V/cm. La migration des SCMK se fait de la cathode vers l'anode.

Après l'électrophorèse les gels sont coupés en deux par la tranche et colorés avec une solution de nigrosine à 1 p. 1000 dans un mélange méthanol-eau-acide acétique (45-45-10)(V/V).

La décoloration des gels se fait dans le mélange méthanol eau-acide acétique (30-65-5)(V/V).

Les gels sont ensuite conservés en tubes fermés dans le mélange ci-dessus.

I - MESURE DES MOBILITES RELATIVES DES PROTEINES EN GEL D'AMIDON
(T 18)

Les distances de migration des protéines sont mesurées sur les photographies des gels. Les mobilités électrophorétiques relatives sont calculées par rapport à une protéine déterminée qui est soit présente dans le mélange, soit introduite sous la forme d'un témoin interne. On détermine les distances de migration des deux extrémités de la bande témoin par rapport au point de départ et on prend la valeur moyenne. Cette valeur sert à calculer les mobilités relatives qui sont exprimées par deux nombres : le premier donne la valeur correspondant à la partie cathodique de la bande et le second correspond à la partie anodique la plus rapide. On a ainsi d'une part une idée précise de la position de la bande sur le diagramme et d'autre part de sa largeur.

J - ESTIMATION DES POIDS MOLECULAIRES PAR LA METHODE DE GEL-FILTRATION (T 19)

Nous avons appliqué la méthode décrite par WHITAKER (157) Une colonne de Sephadex est étalonnée en utilisant des protéines de poids moléculaires connus. On détermine le volume d'élu-tion (V_e) de chacune de ces protéines. Les protéines de très haut poids moléculaire ne diffusent pas dans les pores du gel et sont exclues. Ces protéines ont un volume d'élu-tion correspondant au volume mort de la colonne (V_0).

WHITAKER a montré qu'il existe une relation linéaire entre le rapport $\frac{V_e}{V_0}$ pour une protéine donnée et le logarithme de son poids moléculaire.

Dans le cas des kératines, nous avons utilisé la filtra-tion sur Sephadex G200, dans les conditions décrites plus loin (T 25 et T 26). L'étalonnage d'une colonne de 108 cm de haut et de 4,4 cm de diamètre nous a donné les résultats

suivants :

	<u>Volume</u> <u>d'élu</u> tion (en ml)	<u>V/V₀</u>	<u>Poids</u> <u>moléculaire</u>
Bleu 2000	592,9	1,000	2.000.000
α_2 -macroglobuline	604,1	1,019	850.000
γ -globuline	599,7	1,011	156.000
Sérumalbumine bovine	990,9	1,671	70.000
α -chymotrypsine	1.155,4	1,949	22.500
Cytochrome c (monomère)	1.244,2	2,098	12.400

Les valeurs de ce tableau obtenues pour des protéines déposées séparément montrent que les γ -globulines sont pratiquement exclues du gel de Sephadex G200. Théoriquement ces protéines devraient être retenues puisqu'on parvient très facilement à les séparer de l' α_2 -macroglobuline par cette méthode. Si les protéines sont déposées sous la forme d'un mélange de l'ensemble, les valeurs obtenues sont différentes. Pour les γ -globulines on obtient un rapport $\frac{V_e}{V_0} = 1,33$. Pour la sérumalbumine $\frac{V_e}{V_0}$ reste constant avec une valeur de 1,68 tandis qu'il s'élève pour le cytochrome c à 2,66. En pratique, on note que la relation entre $\frac{V_e}{V_0}$ et le logarithme du poids moléculaire est linéaire entre le cytochrome c et la sérumalbumine. Pour les molécules plus grosses, on note une diminution de la pente de la courbe représentative de cette relation.

K - ULTRACENTRIFUGATION (T 20)

Les ultracentrifugations ont été effectuées par la Station Centrale du C.N.R.S.. Nous tenons à remercier tout particulièrement M. le Pr. WURMSER et ses collaborateurs de leur très compétente collaboration.

III - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SEPARATION DES PROTEINES

A) CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE (T 21)

Les chromatographies sont faites sur des colonnes de DEAE-cellulose (Anion Exchange Diethylaminoethylcellulose POWDER DE 50 Whatman) d'un diamètre intérieur de 22 mm. Après tassage à l'air comprimé sous une pression de 1 kg/cm^2 , la DEAE-cellulose occupe une hauteur de 23 cm dans la colonne.

Le tassage de la colonne est effectué à partir d'une suspension de DEAE-cellulose dans le tampon choisi. Le tampon de cette suspension a été renouvelé plusieurs fois jusqu'à l'équilibre, c'est-à-dire jusqu'à pH constant. Cette suspension dégazée est alors versée dans la colonne et tassée. La colonne est ensuite équilibrée une dernière fois pendant une nuit à l'aide du même tampon. Après contrôle du pH de l'effluent, une solution de 500 mg de protéines dans 15 ml de tampon est introduite au sommet de la colonne par fractions de 5 ml. On rince cinq fois avec 2 ml de tampon et on procède à l'élution. Signalons cependant que dans la première partie de notre travail (voir chapitre III), l'élution des protéines a été faite en utilisant 2 tampons (un tampon phosphate de sodium de pH 6,6 et un tampon alcalin constitué par une solution de carbonate de sodium).

Ultérieurement, nous avons remplacé le carbonate de sodium par du Trishydroxyméthylaminométhane.

Le tampon d'équilibrage est une solution 0,05 M de Tris, de pH 10,4. L'élution est obtenue par un gradient de chlorure de sodium (0 à 1 M). L'utilisation d'un tampon Tris 0,05 M - NaCl 1 M - urée 8 M permet de compléter l'élution.

B) REALISATION DES GRADIENTS DE CONCENTRATION POUR LES ELUTIONS CHROMATOGRAPHIQUES (T 22)

Les gradients linéaires de chlorure de sodium sont réalisés à l'aide de deux chambres cylindriques communiquant

par leur partie inférieure au moyen d'un tube capillaire.

La chambre de mélange munie d'un agitateur constitué d'une lame verticale de Teflon contient le tampon sans NaCl, l'autre chambre contient le tampon à la concentration finale désirée en NaCl.

a) Pour les colonnes de 2,2 cm de diamètre et de 23 cm de hauteur on utilise des chambres de 21 cm de hauteur et de 4,4 cm de diamètre. Chaque chambre contient 300 ml de tampon, occasionnellement 350 ml si on désire un gradient plus lent.

b) Pour les colonnes de 1 cm de diamètre et de 25 cm de hauteur on utilise des chambres de 20 cm de hauteur et de 3 cm de diamètre. Chaque chambre contient 100 ml de tampon.

C) FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL
(T 23)

1) Chromatographie sur Sephadex G75 (T 24)

Les gels sont faits avec du Sephadex G75 (*)

Deux types de tampon ont été utilisés :

1) Urée 8,3 M (500 g/l), acide thioglycolique 0,035 M ; le pH est ajusté à 4,0 avec de la potasse à 1000 g/l.

(*) Dans le Chapitre III du présent mémoire nous avons utilisé du Sephadex G75 (fraction Médium-Water Regain 7,9 g). Ultérieurement nous avons utilisé du Sephadex perlé (T 5) dès que cette présentation fut commercialisée.

L'homogénéité de la granulation du Sephadex perlé permet d'éliminer toute la phase de tamisage exposée plus loin et donne un écoulement plus régulier des colonnes.

2) Urée 8 M ou 4 M, Trishydroxyméthylaminométhane 0,05 M ; le pH est ajusté à 8,0 avec HCl 5,6 N.

Le premier tampon est un milieu réducteur qui est bien adapté à la chromatographie des kératines réduites non carboxyméthylées.

Le second est utilisé exclusivement pour la chromatographie des SCMK ou des kératoses.

On laisse gonfler le Sephadex dans un des tampons précédents pendant une nuit, puis on le rince rapidement à l'eau distillée et on tamise par petites fractions sur un tamis n° 60 (ou 80). Seule la fraction retenue par le tamis est récupérée, puis rééquilibrée avec le tampon urée-acide thioglycolique. On profite de ces rééquilibrages successifs pour éliminer les particules les plus fines qui peuvent encore rester en suspension. Au cours de la décantation, la limite supérieure du gel doit être rapidement nette. La suspension (correspondant à 40 - 45 g de Sephadex sec) est ensuite versée dans une colonne de 55 cm de hauteur et de 3,5 cm de diamètre, surmontée d'un entonnoir à col large d'une capacité de 3 litres environ et munie à sa partie inférieure d'une plaque de verre fritté de porosité n° 2. La suspension étant versée, on arrête le débit de la colonne et on laisse décanter le Sephadex pendant une nuit. Ce n'est que lorsque la décantation est complète que l'on fait débiter la colonne. Le gel se tasse et, lorsque le niveau du gel de Sephadex est devenu constant, on arrête l'écoulement de la colonne, on enlève l'excédent du gel pour ne laisser qu'une hauteur de 45 cm. On ajuste sur la colonne une tête d'adduction constituée par un rodage surmonté d'un tube capillaire. On fait couler du tampon frais pendant 24 heures pour équilibrer la colonne. Enfin, on élimine l'excès de tampon au dessus du niveau de la colonne et on dépose une solution de 150 mg de SCMK dans 8 ml de tampon. Lorsque cette

solution a pénétré le gel, on rince avec 1 ml de tampon. Après rinçage on ajoute une dizaine de ml de tampon, on dépose un petit disque de mousse de polyuréthane qui flotte à la surface du liquide et évite les remous, et on rebouche la tête d'adduction. Pour une pression dans la colonne correspondant à une hauteur de 40 cm de tampon, le débit est d'environ 30 ml à l'heure. Une telle colonne peut fonctionner pendant plusieurs mois. La reproductibilité des fractionnements est parfaite.

2) Chromatographie sur Sephadex G200 (T 25)

Le Sephadex utilisé est du Sephadex perlé (PHARMACIA, Uppsala, lot n° To 3737) (T 5).

On utilise un tampon Tris-hydroxyméthylaminométhane 0,076 M-acide citrique 0,005 M, sel disodique de l'E.D.T.A. 0,01 M, urée 4 M, chlorure de sodium 0,5 M. Le pH est compris entre 8,6 et 8,7. Le gel de Sephadex est fait directement dans le tampon, cinq jours au moins avant son emploi.

Les colonnes utilisées ont un diamètre intérieur de 4,1 cm et sont remplies de gel sur une hauteur de 103 cm. La couche supérieure du gel est maintenue parfaitement plane à l'aide d'un voile de nylon tendu sur un mandrin creux en "polystyrène cristal" de 4,1 cm de diamètre extérieur et de 6 cm de hauteur. Les dépôts des solutions protéiques sont faits immédiatement après assèchement du gel au niveau du voile par élimination du tampon en excès à l'aide d'une seringue.

Lors de la première utilisation d'une colonne on procède en premier lieu à la stabilisation du gonflement des grains de gel. A cet effet, on fait débiter la colonne pendant 48 heures à son débit d'utilisation. Il est ensuite indispensable que le débit ne varie pas pendant toute la durée ultérieure d'utilisation de la colonne.

Une telle colonne fonctionne ensuite correctement, sans interruption pendant 30 à 40 jours.

3) Détermination des volumes d'éluion (T 26)

Le volume mort des colonnes (V_0) est déterminé à l'aide d'une solution de BLUE DEXTRAN 2000 (PHARMACIA, Uppsala). La concentration est choisie pour avoir une densité optique de 1,210 à 278 m μ et de 0,360 à 623 m μ pour 0,1 cm d'épaisseur. Les lectures sont toujours faites à ces deux longueurs d'onde.

Le recueil des fractions se fait sur un collecteur dont le défilement des tubes est fonction du temps. Le débit de la colonne est maintenu aussi constant que possible à l'aide d'une série de pinces de Mohr qui réduisent progressivement la section du tuyau de TYGON branché à la sortie. Les tubes utilisés sont en verre Pyrex pesant exactement 23,500 g à 0,5 mg près. Ces tubes sont obtenus en les amenant au poids indiqué à l'aide de verre pilé grossièrement et en refondant la masse de verre ainsi ajoutée. Le poids de ces tubes est contrôlé après 4 à 5 cycles de service. Nous n'avons jamais observé de variations dépassant 0,5 mg. On mesure la densité du tampon utilisé à chaque essai. On en déduit le volume de chaque fraction. L'ensemble de ces opérations est très rapide. C'est, à notre avis, la seule façon de procéder. Tous les systèmes introduisent des erreurs variables entre 5 et 10 p. 100. En particulier, le système de siphon procure une précision illusoire, le volume débité variant considérablement avec les variations de tension superficielle des solutions, particulièrement au moment du passage des protéines. Ce phénomène est encore plus sensible lors de l'utilisation de solutions de forte molarité en urée. Rappelons qu'un autre système intéressant, consiste à faire débiter la colonne à l'aide d'une pompe proportionnante et à recueillir les fractions

à intervalles de temps réguliers. Mais, dans ce cas encore, l'usure progressive des tuyaux de la pompe peut introduire des erreurs.

4) Chromatographie sur DEAE-SEPHADEX (T 27)

a) Préparation du DEAE-Sephadex

Dans un bécher de 2 l contenant 10 à 20 g de NaCl et 1500 ml d'eau, on verse lentement et sous agitation magnétique le DEAE-Sephadex en évitant les grumeaux. On laisse gonfler une nuit, rince à l'eau et essore.

On remet en suspension dans l'eau et on ajoute 50 p. 100 en volume d'HCl 0,2 N. Après quelques minutes on essore, remet en suspension dans l'eau, et ajoute un volume de NaOH 0,2 N. On laisse en contact 10 minutes. On essore et remet en suspension dans NaOH 0,2 N. On laisse en contact 30 minutes. On filtre et recommence le traitement à la soude 0,2 N.

On rince à l'eau jusqu'à neutralité puis équilibre avec le tampon à utiliser.

On profite de toutes ces opérations pour éliminer les fines particules de DEAE-Sephadex. La régénération du DEAE-Sephadex après utilisation est effectuée en faisant un traitement à la soude comme ci-dessus.

b) Chromatographie

Les colonnes sont tassées comme le Sephadex ordinaire. Nous avons utilisé différents types de colonnes et différentes conditions suivant les séparations recherchées. Le débit de toutes les colonnes est réglé entre 30 et 40 ml/heure.

1) Chromatographie en tampon Tris de pH 10,4.

Le tampon est une solution 0,05 M de Tris-hydroxyméthylaminométhane.

α) Une colonne de 11 cm x 1 cm et l'utilisation d'un

gradient de NaCl 0,25 à 1 M (chambres de 3 cm de diamètre et 20 cm de hauteur) permettent une séparation assez voisine de celle obtenue sur DEAE-cellulose.

β) Une colonne de 20 cm x 1,8 cm et l'utilisation d'un gradient de NaCl 0,25 à 1 M (chambre de 4,4 cm de diamètre et 21 cm de hauteur) permettent en plus de l'échange ionique de faire intervenir le phénomène de gel-filtration. On obtient une meilleure séparation des différents groupes de protéines.

2) Chromatographie en tampon Tris de pH 10,4 et en milieu urée 4 M.

Ce tampon est utilisé pour obtenir le maximum d'effet de désagrégation et un très haut pouvoir de séparation.

On utilise alors des colonnes de 2,1 cm de diamètre et 60 cm de hauteur.

Le gradient NaCl 0,25 à 1 M est réalisé à l'aide de chambres de 4,4 cm x 21 cm.

IV - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES COMPOSANTS MORPHOLOGIQUES DE LA LAINE

A) HYDROLYSE PEPSIQUE SELON BISERTE ET PIGACHE (158) (T 28)

Des échantillons de 8 à 10 g de laine sont mis en suspension dans cinquante fois leur poids d'acide chlorhydrique N/10. On ajoute à la suspension une quantité de pepsine cristallisée telle que le rapport enzyme/substrat soit de 1/100 (en poids). Les hydrolyses sont réalisées entre 37 et 40°C pendant 10 jours avec agitation manuelle plusieurs fois par jour. La laine hydrolysée est ensuite essorée sur creuset filtrant à pores larges, rincée à l'eau distillée, puis neutralisée 24 h. dans une solution de pyridine à 1 p. 100 (v/v). La laine est essorée, rincée à nouveau puis lavée 48 h dans l'eau distillée. Après avoir été essorée une nouvelle fois, elle est séchée à l'étuve à 37°C.

B) DESAGREGATION MECANIQUE DE LA LAINE HYDROLYSEE PAR LA PEPSINE (T 29)

La méthode générale utilisée est sensiblement celle décrite par LEVEAU (159). La laine hydrolysée (7 à 8 g) est mise en suspension dans 400 à 500 ml d'eau distillée et soumise durant une minute à l'action d'un broyeur à couteaux (du genre de ceux utilisés pour les usages culinaires). Après désagrégation partielle, le broyat est filtré sur une toile métallique (16 mailles/cm²). La "maille réelle" d'un tel tamis est nettement plus faible car la laine elle-même joue le rôle de filtre. Une certaine quantité de cellules passe au travers du filtre. Le résidu fibreux est remis en suspension dans l'eau un certain nombre de fois puis refiltré jusqu'à ce qu'il ne dégage plus de cellules. Les suspensions cellulaires obtenues par filtration sont réunies et on isole une fraction de très fines cellules par tamisage sur un tamis à 3.600 mailles/cm² : la sous-fraction ainsi obtenue (Figure 36) est broyée pendant 10 mn à la plus grande vitesse du broyeur à couteaux.

Ce traitement n'affecte pratiquement pas les cellules, mais réduit les débris cuticulaires en fragments qui peuvent passer au travers un verre fritté n° 2 à pores larges (LEVEAU) (160) (Figure 37). En repassant plusieurs fois sur le verre fritté, on obtient ainsi facilement une fraction cellulaire débarrassée de cuticule (Figure 38). Le résidu fibreux précédent est alors remis en suspension dans l'eau, puis soumis à un nouveau à un broyage de une minute. On extrait alors les cellules comme précédemment. On soumet ainsi la fibre à des broyages successifs jusqu'à ce que la désagrégation ne libère presque plus de cellules.

C) HYDROLYSE PEPSIQUE SELON MOSCHETTO, BISERTE et PIGACHE (161)(T 30)

Les conditions générales d'hydrolyse sont identiques à



FIGURE 36

Suspension de
cellules corticales
et cuticulaires
G = 800



FIGURE 37

Débris cuticulaires
obtenus par broyage rapide
et filtration sur verre
fritté n° 2
G = 800

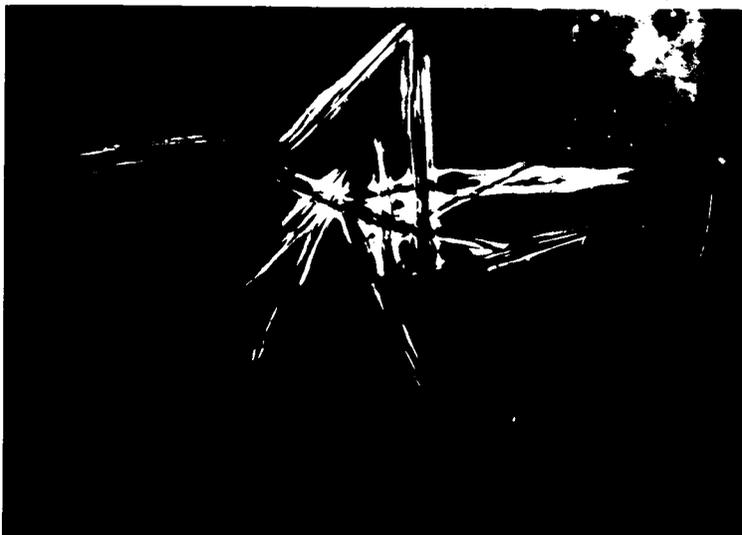
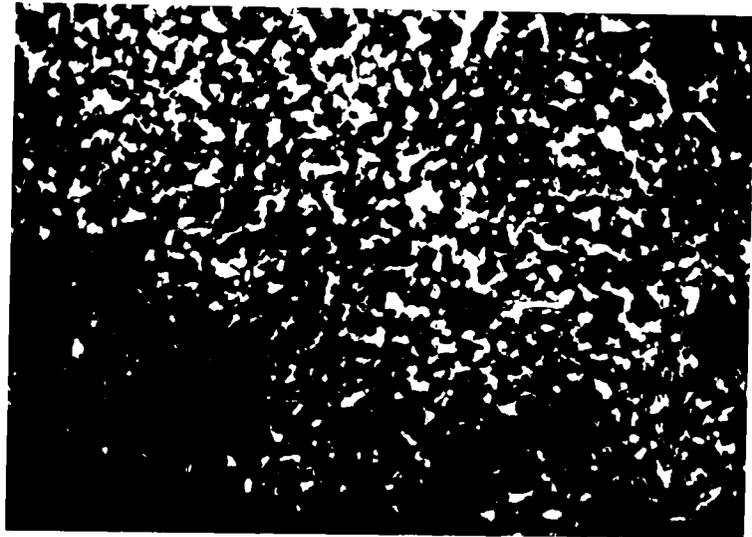


FIGURE 38

Cellules corticales
débarrassées des
cellules cuticulaires
G = 800



celles décrites au paragraphe précédent, mais le milieu d'hydrolyse a la composition suivante : HCl 0,1 M - Acétate de sodium, $3H_2O$ 0,044 M - NaOH 0,006 M - pH 1,8. La laine ainsi hydrolysée libère une abondante quantité de cellules corticales que l'on peut isoler facilement.

D) ISOLEMENT DES CELLULES CORTICALES (T 31)

La laine hydrolysée est mise en suspension dans l'eau distillée et pressée à la main. Cette simple opération suffit à libérer une importante quantité de cellules. L'opération est recommencée sur le résidu fibreux jusqu'à ce qu'il ne se dégage pratiquement plus de cellules. A titre indicatif, pour un échantillon de 100 g de laine, on pratique 50 rinçages nécessitant 50 litres d'eau environ. Les cellules sont isolées par tamisage sur un tamis (16 mailles au cm^2).

E) PURIFICATION DES CELLULES ORTHOCORTICALES (T 32)

Les cellules brutes sont mises en suspension dans une solution aqueuse de pyridine à 1,3 p. 100 (volume/volume) à raison d'environ 100 ml de solution par gramme de cellules brutes. La suspension est homogénéisée manuellement avec un agitateur de verre. On laisse alors décanter plusieurs heures. Après décantation on obtient deux couches parfaitement séparées, une couche surnageante qui représente de 10 à 15 p. 100 du poids total des cellules et qui se présente au microscope comme constituée d'amas de cellules non désagrégées, de débris de fibres, de cellules cuticulaires et de cellules isolées ; la couche inférieure déposée au fond du vase à décantation est constituée uniquement de cellules et de débris cuticulaires.

La couche supérieure est éliminée par succion à l'aide d'un ajutage communiquant avec le vide d'une trompe à eau. L'opération de mise en suspension, la décantation et la séparation

sont recommencées encore 2 fois. Au cours des deux dernières opérations, la couche supérieure se réduit à une fine pellicule, la couche inférieure est essorée et rincée 48 heures dans l'eau distillée. On procède ensuite à un broyage des préparations de cellules brutes à l'aide d'un broyeur à couteaux en vue de désagréger les débris cellulaires. Les cellules sont ensuite filtrées par petites quantités sur verre fritté n° 2 et séchées à 37°C.

F) PURIFICATION DE LA FRACTION FIBREUSE PARACORTICALE (T 33)

Après élimination des cellules par rinçage, le résidu fibreux est mis en suspension dans l'eau à raison de 10g environ pour 500 ml d'eau et traité par un broyeur à couteaux pendant 10 périodes consécutives de 2 à 3 minutes chacune. On profite des périodes nécessaires au refroidissement du broyeur pour éliminer par filtration les cellules qui se dégagent. Il faut prendre garde qu'au cours du broyage, la température de la suspension ne s'élève pas au-dessus de 40°C. Les cellules ainsi éliminées ne sont pas récupérées.

G) ETUDE DE LA CINETIQUE DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE (T 34)

Les hydrolyses de différentes durées sont pratiquées sur des échantillons de 1 g de laine suivant les modalités techniques exposées ci-dessus, en présence d'acétate de sodium. Le pH est contrôlé plusieurs fois par jour et au besoin ajusté à 1,8 avec de l'acide chlorhydrique N. Au cours de l'ajustement du pH, le volume d'acide chlorhydrique ajouté est exactement mesuré et les dosages de l'azote protéique dans l'hydrolysate sont ultérieurement corrigés en fonction de ces additions et de la quantité de pepsine utilisée.

Le taux d'hydrolyse est évalué d'une part en pesant la laine résiduelle non hydrolysée, d'autre part en dosant l'azote

protéique solubilisé au cours de l'hydrolyse par la méthode de Kjeldahl.

Au cours de ces expériences, le milieu d'hydrolyse n'est jamais renouvelé et il n'y a pas d'addition d'enzyme.

H) ESTIMATION PONDERALE DU TAUX D'HYDROLYSE (T 35)

La laine résiduelle est séparée du milieu d'hydrolyse par filtration sur creuset filtrant à pores fins, préalablement taré (porosité n° 3), puis mise en suspension 24 heures dans 400 ml d'une solution aqueuse de pyridine à 1 p. 100 (p/v) à la température du laboratoire. On lave ensuite 48 heures à l'eau distillée, renouvelée deux fois, puis essore sur le creuset filtrant. On sèche alors 24 heures à l'étuve à 40°C, puis 4 heures à 105°C. Les échantillons sont refroidis en atmosphère anhydre sur P_2O_5 et sont pesés.

I) ESTIMATION PONDERALE DU TAUX DE LIBERATION DES CELLULES CORTICALES (T 36)

Les échantillons de laine hydrolysée, après pesée pour estimation du taux d'hydrolyse, sont remis en suspension 24 h dans l'eau distillée. Cette suspension est alors filtrée sur un tamis de 16 mailles au cm^2 .

On procède à 7 lavages et tamisages sur chaque échantillon en utilisant 500 ml d'eau par lavage. Pour aider la libération des cellules, la laine en suspension est agitée manuellement avec une pince brucelle. On pèse d'une part les cellules corticales libérées et d'autre part, le résidu fibreux (après séchage 24 h à 40°C et étuvage de 4 heures à 105°C). Les deux pesées permettent de contrôler qu'il n'y a pas eu de pertes par suite des manipulations successives. Le bilan pondéral de récupération est toujours de l'ordre de 97 à 102 p. 100.

Nous avons vérifié sur plusieurs échantillons que le taux de cellules dégagées n'est pas influencé par le fait d'avoir porté préalablement la laine hydrolysée 4 heures à 105°C.

J) HYDROLYSE PEPSIQUE AVEC RENOUELEMENT QUOTIDIEN
DU MILIEU D'HYDROLYSE (T 37)

Les hydrolyses sont faites de la manière habituelle. Chaque jour l'ensemble des échantillons correspondant à 1 g de laine est soigneusement essoré sur un creuset filtrant à pores fins (préalablement taré) puis remis en suspension dans 50 ml de tampon pH 1,8, dans lequel on a dissout juste avant l'emploi 10 mg de pepsine.

Le creuset filtrant taré utilisé pour chaque échantillon est toujours le même jusqu'à la fin de l'hydrolyse. La laine hydrolysée est ensuite traitée de la manière habituelle en vue de l'estimation des taux d'hydrolyse et de libération des cellules corticales.

K) IDENTIFICATION DES CELLULES CORTICALES DE LA LAINE
A L'AIDE DU "BLEU LACTOPHENOL" (T 38)

L'utilisation de ce réactif histochimique est recommandé par NOPITSCH (162) pour le diagnostic de l'altération de la laine par divers agents. Son utilisation pour la différenciation des cellules ortho- et paracorticales de la laine a été introduite par LEVEAU (163). La composition du réactif est la suivante :

Solution 1 : Acide lactique	20 ml
Phénol	20 g
Glycérine	40 ml
Eau distillée	20 ml

Solution 2 : Solution aqueuse de Bleu pour coton II (BAYER)
saturée à froid.

On mélange 50 ml de la solution (Lactophénol) et 10 ml de la solution 2;

Les coupes transversales de la laine ou les cellules corticales sont montées entre lame et lamelle dans une goutte de Bleu lactophénol. Au bout de cinq à dix minutes la préparation est examinée au microscope en contraste de phase. Les cellules orthocorticales sont colorées en bleu foncé, tandis que les cellules paracorticales prennent peu de colorant et apparaissent comme des fuseaux brillants.

L) DETERMINATION DES TAUX D'EXTRACTION PAR LE THIOLYCOLATE DE POTASSIUM (T 39)

Des échantillons de 1 g des fractions étudiées (ramené en poids anhydre) sont traités 2 h par 100 ml de thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 11 et à 50°C. Si la fraction traitée est fibreuse, on filtre sur creuset filtrant taré. Si la fraction est cellulaire, on centrifuge pour isoler la partie non attaquée : toute filtration est impossible, car les filtres se colmatent instantanément. Après filtration ou centrifugation on rince deux fois à la température ordinaire avec 50 ml de thioglycolate 0,1 M à pH 11, puis plusieurs fois à l'eau distillée. Après le dernier rinçage, dans le cas d'un substrat centrifugé, le culot de centrifugation est déposé sur un creuset filtrant taré. On essore ensuite soigneusement et laisse sécher 24 h sous vide et sur P_2O_5 , puis 48 h à 40°C à l'étuve et enfin 4 h à 105°C. Après pesée du résidu on déduit le taux d'extraction par différence.

V - S-CARBOXYMETHYLKERATINES (PREPARATION - PURIFICATION - HYDROLYSE).

A) PREPARATION DES S-CARBOXYMETHYLKERATINES (SCMK) (T 40)

1) Extraction (T 41)

La laine ou les fractions morphologiques étudiées sont traitées par une solution aqueuse de thioglycolate de potassium 0,1 M ajustée à pH 11,0 avec de la potasse à 1000 g/l.

L'extraction dure 2 heures à 50°C sous agitation douce. On utilise 100 ml de thioglycolate par gramme de laine traitée.

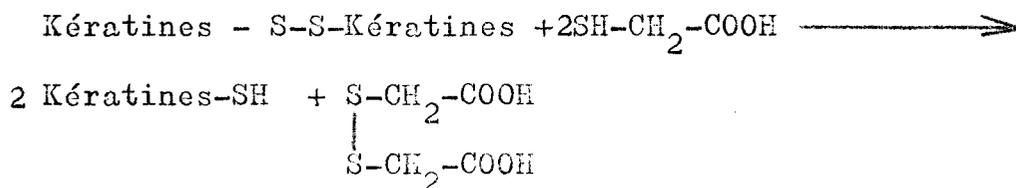
Les solutions de thioglycolate de potassium sont faites à partir de solution 10 M d'acide thioglycolique. Après extraction le résidu est éliminé soit par filtration, soit par centrifugation.

Les extraits sont refroidis rapidement à 10°C et les protéines sont précipitées par abaissement du pH aux environs de 4,5-5 à l'aide d'acide acétique à 30 p. 100 (v/v).

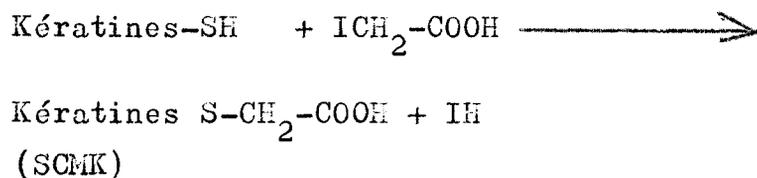
Après décantation et élimination du surnageant, le précipité est redissout dans le minimum de thioglycolate et maintenu en suspension par agitation douce. Le pH est amené lentement aux environs de 10-10,5 à l'aide de KOH N. La solubilisation du précipité commence vers pH 8. On laisse 30 minutes sous agitation pour obtenir une solution limpide.

2) Carboxyméthylation (T 42)

Les groupements thiol apparus par réduction au thioglycolate,



sont bloqués à l'aide d'acide monoiodoacétique.



Cette carboxyméthylation évite la reformation des ponts disulfure.

On prépare une solution concentrée d'acide monoiodoacétique qu'on amène à pH 6 -7 à l'aide de potasse. On utilise 50 g d'acide monoiodoacétique pour 10 g de laine traitée. La totalité de la solution d'acide monoiodoacétique est versée dans les extraits. Le pH baisse très rapidement et il est maintenu constant entre 8 et 8,5 par addition de potasse, soit manuellement, soit à l'aide d'un autotitrateur. Lorsque la réduction est terminée le pH se stabilise. On vérifie à l'aide du "test au nitroprussiate de potassium" qu'il n'y a plus de groupement SH libre. A partir de ce moment, on attend encore une demi-heure. On dialyse ensuite sous agitation contre de l'eau distillée renouvelée fréquemment. Les solutions sont ensuite lyophilisées. Les protéines ainsi obtenues ne sont remises en solution qu'au moment de leur utilisation.

3) Test au nitroprussiate de sodium (T 43)

La présence de groupements SH libres peut être mise en évidence par la coloration rouge intense qui apparaît en milieu ammoniacal par addition de nitroprussiate de sodium (GREENSTEIN) (164) et GREENSTEIN et EDSALL (165).

A 1 ml de la solution protéique on ajoute 1 goutte d'ammoniaque concentrée et 1 goutte d'une solution aqueuse de nitroprussiate de sodium à 5 p. 100 (p/v).

En présence de groupement-SH une coloration rouge intense persistante se développe immédiatement.

B) FRACTIONNEMENT DES SCMK PAR PRECIPITATION A pH 3,9 (T 44)

Le fractionnement des SCMK à pH 3,9 et en milieu de force ionique 0,4-0,5, est réalisé suivant la méthode de GILLESPIE et coll. (166) et de WOODS (167).

Il permet d'obtenir deux fractions.

La première est insoluble et contient moins de soufre que les kératines dont elle est issue : elle constitue les SCMK-A. La seconde est soluble et contient au contraire plus de soufre : elle constitue les SCMK-B.

C) PURIFICATION DES SCMK-A PAR PRECIPITATION ACETONIQUE (T 45)

Ma précipitation à pH 3,9 des SCMK permet de séparer les SCMK-A des SCMK-B.

Les SCMK-A contiennent encore des composants mineurs rapides ainsi que le révèle l'électrophorèse libre.

Nous avons donc complété le fractionnement en faisant des précipitations partielles à l'acétone suivant une technique décrite par COHN et al. (168) et appliquée avec succès par GILLESPIE (169) aux protéines extraites de la laine vierge par le thioglycolate de potassium. Nous avons repris les conditions expérimentales décrites par ces auteurs. La solution aqueuse de protéine à 0,2 p. 100 est ajustée à pH 5 (valeur voisine du pH de précipitation). On précipite alors par l'acétone qu'on ajoute par petites fractions jusqu'à ce qu'environ 60 p. 100 de la quantité initiale de protéines soient précipitées (*).

(*) On évalue la quantité de protéines précipitées en estimant la concentration protéique dans le surnageant après chacune des dernières additions d'acétone. Cette estimation est faite par évaluation spectrophotométrique de l'intensité de la coloration du biuret et en se référant à une courbe étalon préalablement établie.

La fraction précipitée est filtrée, rincée à l'eau, remise en solution par alcalinisation, dialysée, puis lyophilisée. Les protéines ainsi traitées sont remises en solution dans l'eau (concentration 2,2 p. 100) puis reprécipitées par l'acétone dans les mêmes conditions que ci-dessus. Toutefois, la précipitation est arrêtée lorsque environ 80 p. 100 des protéines redissoutes sont précipitées. Le précipité final est traité comme ci-dessus jusqu'à la lyophilisation. Après cette seconde étape de purification, une solution de cette fraction protéique étudiée en électrophorèse libre montre un abaissement très net de la teneur en composants mineurs. Toutefois l'élimination de ces derniers est incomplète.

D) EXTRACTION FRACTIONNÉE DES KERATINES PAR LE THIOGLYCOLATE
(T 46)

1) Extraction à 0°C (T 47)

15 g de laine dégraissée sont traités pendant 16 h à 0°C dans 1500 ml de thioglycolate de potassium 0,1 M (pH 11) sous agitation douce. La laine résiduelle est séparée du filtrat par filtration sur entonnoirs à verre fritté de porosité n° 2. Les protéines sont ensuite traitées de la manière habituelle jusqu'à la carboxyméthylation. Toutes ces opérations sont faites à 4°C.

2) Extraction à 50°C (T 48)

La laine résiduelle du traitement précédent est mise en suspension dans 1000 ml de thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 11. Une nouvelle extraction est faite pendant 2 heures à 50°C. Les produits isolés sont ensuite carboxyméthylés.

3) Extraction à 50°C en présence d'urée 8 M (T 49)

La laine résiduelle du traitement précédent est mise en suspension dans une solution de thioglycolate de potassium 0,1 M

de pH 11 et 8 M en urée. L'extraction dure 2 heures à 50°C. Les extraits sont dialysés une nuit contre une solution de thioglycolate 0,1 M de pH 7 pour éliminer l'urée. Les protéines sont ensuite précipitées à pH 4,5-5, redissoutes dans le minimum de thioglycolate 0,1 M pH 11 puis carboxyméthylées.

4) Détermination des taux d'extraction (T 50)

Des échantillons de 2 g de laine (poids anhydre) sont soumis aux extractions successives d'abord 16 h à 0°C, puis ensuite 2 h à 50°C, puis 2 h à 50°C en présence d'urée 8 M, chaque fois dans 200 ml de thioglycolate. La laine résiduelle est filtrée sur creuset filtrant taré, puis rincée 3 fois à l'eau. Après essorage complet on déshydrate sur P₂O₅ sous vide puis à l'étuve à 40°C pendant 48 heures et enfin 4 h à 105°C. Les pertes sont déterminées par pesée du résidu.

Les opérations de rinçage et de déshydratation sur P₂O₅ sont faites à 40°C pour la détermination des taux d'extraction à 0°C.

5) Estimation du taux de protéines riches et pauvres en soufre (T 51)

Des échantillons de 2 grammes de S-carboxyméthylkératines sont solubilisés dans 200 ml d'une solution 0,1 M d'acétate de sodium. Cette solution est amenée à pH 10-10,5 avec NaOH N/1 pour avoir une dissolution parfaite des protéines, on ajoute alors du chlorure de sodium pour amener la molarité en sel à 0,3 M. On précipite ensuite à l'aide d'acide acétique concentré jusque pH 3,9. La force ionique du milieu est comprise entre 0,4 et 0,5.

On laisse décanter et filtre sur verre fritté taré, à pores larges (sans dépression). Le filtrat est dialysé et lyophilisé.

Il constitue la fraction soluble riche en soufre.

Le précipité est solubilisé dans les mêmes conditions que ci-dessus, puis précipité à nouveau. Le surnageant contient encore une certaine quantité de fractions riches en soufre que l'on récupère.

Le précipité repris dans le minimum d'eau alcalinée à pH 10 avec NaOH N/1 est remis en solution, dialysé et lyophilisé : il représente la fraction pauvre en soufre.

Les pourcentages sont exprimés en se référant aux poids de protéines lyophilisées. Le taux de récupération est toujours voisin de 100 p. 100.

E) HYDROLYSE PEPSIQUE DES S-CARBOXYMETHYLKERATINES

1°) Hydrolyse (T 52)

500 mg de S-carboxyméthylkératines sont solubilisés dans 20 ml d'eau alcalinisée par 1 goutte de soude N/1. Sous agitation, on ajoute 30 ml de tampon acétate de pH 1,8 et ajuste à ce pH. On amène alors à 95 ml avec du tampon pH 1,8 et agite à 40°C. Ces protéines d'abord précipitées se redissolvent. On injecte alors à l'aide d'une seringue une solution de 5 mg de pepsine dans 5 ml de tampon pH 1,8.

La cinétique est suivie en prélevant à intervalles déterminés des échantillons de 1 ml qui sont portés à l'ébullition rapidement pour inhiber la pepsine puis refroidis immédiatement à l'eau et congelés à - 70°C (acétone et neige carbonique) en attendant de faire les dosages ultérieurs.

2°) Détermination du taux d'hydrolyse (T 53)

Le nombre de groupes $\alpha\text{-NH}_2$ terminaux libres apparus par coupure des liaisons peptidiques est évalué par estimation de la coloration donnée à la ninhydrine, exprimée en équivalents de norleucine.

Le pourcentage d'hydrolyse est évalué en nombre de micromoles d'équivalent norleucine par micromole d'azote protéique, estimée par la méthode de Kjeldahl. Tous les résultats sont corrigés pour la présence de la pepsine et pour la coloration que donne la protéine non hydrolysée avec la ninhydrine.

Nous avons vérifié que le fait de porter la solution protéique à l'ébullition ne provoque pas de coupure décelable par la méthode utilisée.

Pour les temps très courts il se forme, après décongélation, un trouble que l'on peut éliminer par centrifugation. Seuls sont dosés les groupes aminés des protéines solubles.

3^e) Hydrolyse pepsique aux temps courts (T 54)

On dissout 2 g de protéines dans 80 ml d'eau et on y ajoute quelques gouttes de NaOH N/1.

Sous agitation magnétique on ajoute 120 ml de tampon acétate de pH 1,8. On attend que la dissolution soit complète et on ajuste le pH à 1,8. On complète à 395 ml avec du tampon. On amène la température à 40°C puis on ajoute 5 ml d'une solution de 20 mg de pepsine dans du tampon acétate de pH 1,8.

L'hydrolyse dure le temps désiré (0 à 30 minutes).

Après hydrolyse on verse sous agitation rapide la solution protéique dans un bécher de 1 litre contenant 400 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 amenée à 4°C. Après 1 minute d'agitation, on centrifuge à 1000 t/m. Le culot est alors rincé avec un mélange tampon de pH 1,8 - acide trichloracétique à 10 p. 100(v/v) et recentrifugé. Le précipité est solubilisé dans 75 à 100 ml d'eau distillée amenée à pH 5 avec NaOH N/1. On dialyse et on lyophilise.

F) HYDROLYSE TRYPSIQUE DES SCMK (en vue des cartes peptidiques) (T 55)

On dissout 5 mg de protéines dans 0,75 ml d'une solution

de sesquicarbonate d'ammonium à 1 p. 100.

On a préparé au préalable une solution de 3 mg de trypsine dans 1,5 ml de HCl N/16.

Cette solution est mise à incuber 24 h à 37°C pour détruire l' α -chymotrypsine qui peut souiller la préparation de trypsine. La trypsine n'est pas inhibée par ce traitement. On ajoute 40 microlitres de la solution de trypsine à la solution protéique et on porte à l'étuve à 37°C. Le pH est d'environ 8,5.

Au bout de 6 heures d'hydrolyse on ajoute à nouveau 40 microlitres de solution de trypsine et on prolonge l'hydrolyse pendant 24 heures. On ajoute alors 7 à 8 ml d'eau et acidifie à pH 4 avec de l'acide formique, on centrifuge et lyophilise la solution sans dialyser.

Le lyophilisat est repris par 200 microlitres d'eau et cette solution est déposée sur papier Whatman n° 3 en vue des électrochromatographies. On rince avec 100 microlitres d'eau qu'on ajoute au dépôt.

VI - METHODES PARTICULIERES

A) EXTRACTION DES KERATINES PAR LA SOUDE N/10 à 50°C (T 56)

10 g de laine sont traités sous agitation pendant 24 h à 50°C pour un litre de soude N/10. Après filtration sur entonnoir filtrant à pores larges le filtrat est neutralisé avec de l'acide chlorhydrique concentré jusque pH 7. On ajoute quelques gouttes d'alcool octylique et on concentre presque à sec sous vide à 40°C dans un évaporateur rotatif. Le résidu encore humide est repris par 100 ml d'eau. Cette solution très trouble est lyophilisée. Des échantillons de 750 mg de ce lyophilisat sont solubilisés dans 10 ml de tampon Tris 0,05 M ajusté à pH 8,0 avec HCl et 4 M en urée. Cette solution est dialysée deux fois contre 500 ml du même tampon pendant 12 heures pour éliminer les sels, les peptides et les amino-acides libres. La

solution dialysée est alors filtrée sur gel de Sephadex G75 (gros grains) dans du tampon Tris. Les colonnes mesurent 55 cm de hauteur et ont 3,5 cm de diamètre. Le débit est réglé à environ 20 ml/heure. L'éluat est divisé en trois fractions qui sont dialysées et lyophilisées (voir figure 33). Chacune d'elles est soumise à une seconde chromatographie dans les mêmes conditions que la première fois.

B) EXTRACTION DES KERATINES PAR LA SOUDE N/10 à 0°C (T 57)

10 g de laine sont traités sous agitation et pendant 24 heures à 0°C par un litre de soude N/10. Après filtration le filtrat est neutralisé avec HCl concentré. Il se forme un précipité que l'on recueille par centrifugation. Le surnageant est éliminé (il ne contient pas de protéines). Le précipité est lavé par 100 ml d'eau acidifiée par quelques gouttes de HCl N/1, puis à l'eau distillée. Sa solubilisation nécessite un milieu très alcalin et, pour éviter ce traitement trop brutal, il est lyophilisé sous forme d'une suspension aqueuse. Aucun fractionnement ultérieur n'est effectué.

C) DETERMINATION DES TAUX D'EXTRACTION PAR LA SOUDE (T 58)

Les taux d'extraction sont déterminés sur des échantillons de 1 g de laine. Les résidus fibreux sont rincés à l'eau, essorés, séchés 48 heures à 40° puis 4 h à 105°C. Les pesées de ces résidus fibreux permettent de calculer le taux d'extraction. Il est aussi déterminé par dosage de l'azote protéique (Kjeldahl) solubilisé dans le filtrat et les eaux de rinçage.

D) PREPARATION DES α -KERATOSES (T 59)

Deux méthodes ont été utilisées.

La première est celle décrite par ALEXANDER et SMITH (170). La laine est oxydée par l'acide peracétique dilué et les kératoses sont extraites par l'ammoniaque 3 N.

La seconde, décrite par HAYLETT et coll. (171) évite

l'utilisation d'un milieu alcalin. La laine est oxydée par l'acide performique concentré (1 volume d'eau oxygénée à 30 p. 100 + 9 volumes d'acide formique à 98-100 p. 100) à 2-4°C pendant 16 à 18 heures. L'extraction des kératoses est faite selon la méthode de BURLEY (172) par un tampon pyridine-acide acétique-eau (2/0,2./87,8) de pH 6. Les α -kératoses sont précipitées de l'extrait total en abaissant le pH à 4,1 par de l'acide acétique. Elles sont recueillies par centrifugation, puis solubilisées dans du tampon pyridine de pH 6,0 et lyophilisées sans dialyse préalable. Pour 5 g de laine traitée on obtient 340 mg d' α -kératoses.

E) EXTRACTION DES KERATINES PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE 6 N
(T 60)

5 g de laine sont traités pendant 15 minutes par 100 ml de HCl 6 N à la température de 60°C. Après filtration rapide et rinçage par 200 ml d'eau, les extraits dilués à 500 ml sont évaporés sous vide à 40°C dans un évaporateur rotatif. Lorsque le volume de la solution est réduit à 100 ml environ, on ajoute de l'eau pour amener à 500 ml et on évapore à nouveau, jusqu'à un volume final de 50 ml. Cette opération est recommencée une seconde fois. La solution finale est diluée avec 200 ml d'eau, congelée et lyophilisée. La fraction extraite se présente sous la forme d'une poudre brunâtre.

F) EXTRACTION DES KERATINES PAR LE THIOGLYCOLATE D'AMMONIUM
A 0°C (T 61)

10 g de laine sont traités pendant 48 heures à 0°C et sous agitation par une solution de thioglycolate d'ammonium 0,1 M de pH 8,0 et 4 M en urée. Après extraction la fibre résiduelle est éliminée par filtration. Le filtrat est amené à pH 4 à l'aide d'acide acétique puis dialysé pendant 24 heures sous agitation

magnétique contre 5 litres d'eau distillée additionnée de 500 ml de thioglycolate d'ammonium 0,1 M de pH 8 et ne contenant pas d'urée. Le milieu de dialyse reste réducteur et est ajusté à pH 4 avec de l'acide acétique ; il est renouvelé au bout de 12 heures. Les protéines précipitées sont séparées du filtrat par décantation pendant une nuit. Ensuite on élimine le maximum de surnageant et on isole le précipité par une autre centrifugation à très petite vitesse. Le précipité est repris par 50 ml de thioglycolate (0,1 M, pH 8,0, urée 4 M). Sa solubilisation demande 24 h à l'abri de l'air sous agitation magnétique. On procède ensuite à la carboxyméthylation à pH 8. Les SCMK sont alors dialysées contre eau distillée puis lyophilisées. Toutes les opérations précédentes sont effectuées à 4°C. Une préparation en vue de son étude en électrophorèse sur gel d'amidon a subi une seconde carboxyméthylation à pH 8-8,5 en milieu urée 8 M et à la température ordinaire, et est utilisée sans fractionnement ultérieur.

Habituellement, les extraits lyophilisés sont chromatographiés sur Sephadex G75 dans un tampon Tris de pH 8 et 4 M en urée. Les chromatographies sont faites à 0°C. On élue ainsi deux fractions. La première (F 1) constitue l'extrait à 0°C cité dans le texte. La seconde élue beaucoup plus tardivement correspond à des composés de faibles poids moléculaires. Son étude n'a pas été faite. Signalons cependant que ces constituants non protéiques absorbent très fortement à 278 m μ .

G) HYDROLYSE SULFURIQUE DES KERATINES (T 62)

La laine ou les fractions morphologiques étudiées sont hydrolysées par de l'acide sulfurique N/10 à l'ébullition et sous réfrigérant à reflux pendant des périodes comprises entre 40 et 50 heures. Pour une hydrolyse de 5 g de laine on utilise 100 ml d'acide sulfurique N/10.

Après traitement la fraction résiduelle séparée de l'hydrolysate par centrifugation est rincée abondamment. Elle est seule étudiée.

H) HYDROLYSE PEPSIQUE DE LA LAINE EN VUE DE L'ANALYSE DE L'HYDROLYSAT (T 63)

Des échantillons de laine de 500 mg (poids anhydre) coupés finement sont placés 24 h à 40°C dans 24 ml de tampon acétate de pH 1,8 utilisé pour l'hydrolyse pepsique. Pendant ce temps la laine est imprégnée par le tampon et s'équilibre au pH de 1,8.

D'autre part, 25 mg de pepsine sont dissous dans 5 ml du même tampon contenant 25 micromoles de norleucine. De cette façon 1 ml de solution pepsique correspond à 5 micromoles de norleucine.

Au bout des 24 h. d'équilibrage des échantillons de laine dans le tampon de pH 1,8, on ajoute 1 ml de la solution (pepsine + norleucine). A la fin de l'hydrolyse enzymatique l'hydrolysate est isolé par filtration sur creuset filtrant n° 4. Les échantillons sont rincés plusieurs fois avec un total de 20 ml d'eau environ et soigneusement essorés. Le filtrat et les eaux de rinçage sont ensuite congelés et lyophilisés.

I) DOSAGE DES AMINO-ACIDES EN VUE DE L'ANALYSE DES HYDROLYSATS PEPSIQUES (T 64)

Ils sont effectués par la méthode de MOORE et STEIN (T 5). Compte tenu de la présence des sels dans les hydrolysats lyophilisés et pour que les hydrolyses chlorhydriques soient faites dans le même rapport protéine/HCl, la quantité des protéines présente dans les lyophilisats est estimée d'après les taux d'hydrolyse habituellement rencontrés (voir la Figure 6) La totalité de l'hydrolysate est hydrolysée à raison de 1 ml de

HCl 50 p. 100 pour 5 mg de protéines. Par exemple, la courbe représentant la cinétique de l'hydrolyse pepsique de la laine Mérinos (Figure 6) montre qu'en 12 heures on hydrolyse 5 p. 100 de la laine. L'hydrolyse chlorhydrique d'un hydrolysats pepsique de 12 H. de 500 mg de laine sera donc faite en tenant compte de la présence de $\frac{500 \times 5}{100} = 25$ mg de peptides et de 5 mg de pepsine, soit 30 mg de "protéine". C'est-à-dire qu'on utilisera 6 ml de HCl à 50 p. 100 pour l'hydrolyse.

Après hydrolyse, on prélève 1 ml exactement de chaque hydrolysats qu'on dilue de la manière habituelle et on lyophilise. On reprend ensuite par 5 ml d'eau et dose les amino-acides sur 2 ml de cette solution. La quantité de norleucine révélée sur chaque dosage permet de faire la correspondance exacte avec la quantité réelle d'hydrolysats pepsique analysé.

J) PREPARATION DES KERATINES REPONTEES ARTIFICIELLEMENT
(T 65)

15 mg de laine vierge dégraissée (poids anhydre) sont traités par du thioglycolate de potassium 0,1 M à pH 11 et à 50°C pendant 2 heures de la manière habituelle (100 ml de solution de thioglycolate par gramme de laine). Après filtration, la solution protéique est acidifiée vers pH 4,5. Les kératines réduites et solubilisées précipitent. Elles sont abondamment lavées avec un tampon acétate de sodium - HCl 0,1 M de pH 4,5. On décante, rince plusieurs fois à l'eau distillée en décantant à chaque fois pour éliminer les sels. On essore ensuite, on centrifuge, puis on sèche sous vide sur P_2O_5 pendant 3 jours pour éliminer l'eau jusqu'à l'obtention d'une masse flexible. On porte ensuite à l'étuve à 40°C pendant 48 h sous ventilation puis on abandonne 15 jours à 1 mois en chambre froide à 4°C et à l'air libre.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER P. et EARLAND C., Nature (Lond.), 1950, 166, 396.
(4, 7, 10)
- ALEXANDER R.P. et SMITH L.F., Proc. Int. Wool Text. Res. Conf.,
Australia, 1955, B, 56. (116, 117, 170)
- BAMFORD C.H., BROWN L. et al., Nature, 1955, 176, 396. (80)
- BISERTE G., DAUTREVAUX M. et BOULANGER P., Bull. Soc. Chim. Fr.,
1963 (12), 2954. (151)
- BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P.,
J. of Chromatog., 1959, 2, 225. (143)
- BISERTE G. et MOSCHETTO Y., C.R. Acad. Sci. (France),
1962, 255, 3263. (54, 104)
- BISERTE G. et MOSCHETTO Y., Bull. Soc. Chim. (France),
1963, (12), 2932. (144)
- BISERTE G. et OSTEUX R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 50.
(145)
- BISERTE G. et PIGACHE P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 1379.
(17)
- BISERTE G. et PIGACHE P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, 51.
(17)
- BISERTE G. et PIGACHE P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 159.
(42, 51, 153)
- BLACKBURN S., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 56, 1. (19, 31)
- BLOUT E.R., de LOZE C., BLOOM L.M. et FASMAN G.D.,
J. Amer. Chem. Soc., 1960, 82, 3787. (82)
- BOHAK Z. et KATCHALSKI E., Biochemistry, 1963, 2, 228. (81)

- BURLEY R.W., Textile Res. J., 1960, 30, 473. (172)
- BUSSON F., CARBENER R. et LANZA J., Ann. Nutr. et Aliment.,
1960, 14, 1. (137)
- COHN E.J. et al., J. Amer. Chem. Soc., 1946, 68, 469. (168)
- COHN E.J. et al., J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 465. (168)
- COLE R.D., STEIN W.H. et MOORE S., J. Biol. Chem., 1958, 233, 1359.
(139)
- CORFIELD M.C., Biochem. J., 1962, 84, 602. (32)
- CORFIELD M.C., ROBSON A. et SKINNER B., Biochem. J., 1958, 68, 348.
(12)
- CRESTFIELD A.M., MOORE S. et STEIN W.H., J. Biol. Chem.,
1963, 238, 622. (98)
- CREWTHER W.G. et DOWLING L.M., J. Textile Inst., 1960, 51, T 775.
(69)
- CREWTHER W.G., FRASER R.D.B., LENNOX F.G. et LINDLEY H.,
Advances in Protein Chemistry, 1965, 20, 191 à
369. (21, 122, 128)
- CREWTHER W.G., GILLESPIE J.M., HARRAP B.S., O'DONNELL I.J. et
THOMPSON E.O.P., IIIème Congrès Int. Res. Text.
Lainière, PARIS, 1965, Conf. n° 35 (sous presse).
(71, 77, 79, 88).
- DAUTREVAUX M., Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 1105. (133)
- DE DEURWAERDER R., DOBB M.G. et SWEETMAN B.J., Nature, 1964,
203, 48 (123)
- ELOD E. et ZAHN H., Kolloid Z., 1944, 108, 6. (73)
- ELOD E. et ZAHN H., Melliand Textilber., 1944, 25, 361. (73)
- FILSHIE B.K. et ROGERS G.E., J. Cell. Biol., 1962, 13, 1. (30)
- FRASER R.D.B. et LENNOX F.G., The Text. J. Austr., 1962, Janvier,
20. (33)
- FRASER D.B., LINDLEY H. et ROGERS G.E., Biochim. Biophys. Acta,
1954, 13, 295. (120)

- GILLESPIE J.M., Austr. J. Biol. Sci., 1957, 10, 105. (95)
- GILLESPIE J.M., Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27, 225. (5)
- GILLESPIE J.M., Austr. J. Biol. Sci., 1960, 13, 81. (6, 56, 169)
- GILLESPIE J.M., cité dans Colloque "Structure de la Laine",
Institut Textile de France, PARIS, 1961, p. 143.
(112, 126)
- GILLESPIE J.M., Austr. J. Biol. Sci., 1962, 15, 262. (97, 102)
- GILLESPIE J.M., Austr. J. Biol. Sci., 1962, 15, 572. (74)
- GILLESPIE J.M., Austr. J. Biol. Sci., 1963, 16, 241. (74)
- GILLESPIE J.M., Austr. J. Biol. Sci., 1963, 16, 259. (91, 130)
- GILLESPIE J.M. et LENNOX F.G., Biochim. Biophys. Acta,
1953, 12, 481. (6, 14, 58, 60, 62, 94, 100)
- GILLESPIE J.M. et LENNOX F.G., Austr. J. Biol. Sci., 1955, 8, 97.
(58, 60, 62, 94)
- GILLESPIE J.M. et LENNOX F.G., Austr. J. Biol. Sci., 1955, 8,
378. (58, 60, 62)
- GILLESPIE J.M., O'DONNELL I.J. et THOMPSON E.O.P., Austr. J.
Biol. Sci., 1962, 15, 409. (61, 66, 101)
- GILLESPIE J.M., O'DONNELL I.J., THOMPSON E.O.P. et WOODS E.F.,
J. Text. Inst., 1960, 51, T.703. (15, 166)
- GODDARD D.R. et MICHAELIS L., J. Biol. Chem., 1934, 106, 605.
(1, 93).
- GODDARD D.R. et MICHAELIS L., J. Biol. Chem., 1935, 112, 361.
(9)
- GOLDEN R.L., WHITWELL J.C. et MERCER E.H., Text. Res. J.,
1955, 25, 334. (35)
- GREENSTEIN J.P., J. Biol. Chem., 1938, 125, 50. (164)
- GREENSTEIN J.P., J. Biol. Chem., 1939, 128, 233. (164)
- GREENSTEIN J.P. et EDSALL J.T., J. Biol. Chem., 1940, 133, 397.
(165)

- GREENWOOD B.D. et SPEAKMAN P.T., Nature, 1964, 204, 144. (52)
- GUNDLACH M.G., STEIN W.H. et MOORE S., J. Biol. Chem.,
1959, 234, 1754. (67)
- HARRAP B.S., Austr. J. Biol. Sci., 1957, 10, 116. (113, 127)
- HARRAP B.S. et GILLESPIE J.M., Austr. J. Biol. Sci.,
1963, 16, 542. (99, 103)
- HAYLETT T., SOUBERT F.J., SWART L.S. et LOUW D.F., Textile Res. J., 1963, 33, 639. (115, 171)
- HIRS C.H.W., STEIN W.H. et MOORE S., J. Biol. Chem., 1954, 211,
941. (138)
- HORIO M. et KONDO T., Textile Res. J., 1953, 23, 373. (24)
- IKAWA M. et SNELL E.E., J. Biol. Chem., 1961, 236, 1955. (140)
- KASSENBECK P., Colloque "Structure de la laine", Institut
Textile de France, Paris, 1961, p. 51. (119)
- KONIGSBERG W., GOLDSTEIN J. et HILL R.J., J. Biol. Chem.,
1963, 238, 2028. (78)
- KURTZ J., BERGER A. et KATCHALSKI E., Nature, 1956, 178, 1066.
(83)
- LEVEAU M., Bull. Inst. Text. France, 1956, 60, 61. (163)
- LEVEAU M., Bull. Inst. Text. France, 1956, 63, 91. (40, 45, 50,
70, 159, 160)
- LEVEAU M., Bull. Inst. Text. France, 1958, 74, 75. (48)
- LEVY A.L., Nature, 1954, 174, 126. (59, 141, 146)
- LINDERSTROM-LANG K.S., Proteins and Enzymes, Lane Medical
Lectures, Standford University Press, 1952,
p. 59 (86)
- LINDLEY H., Nature (Lond.), 1947, 160, 190. (16, 36, 43)

- LUNDGREN H.P., Proc. Intern. Wool Textile Res. Conf., Australia, 1955, F, 200. (37)
- LUNDGREN H.P. et WARD W.H., Arch. Biochem. Biophys., 1962, suppl. 1, 78 à 111. (20)
- MERCER E.H., Text. Res. J., 1953, 23, 388. (34, 46)
- MERCER E.H., Proc. Intern. Wool Textile Res. Conf., Australia, 1955, F, 215. (28)
- MILLER W.G., J. Amer. Chem. Soc., 1961, 83, 259. (87)
- MOORE S. et STEIN W.H., J. Biol. Chem., 1954, 211, 893. (136)
- MOSCHETTO Y. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 75. (53, 84, 121)
- MOSCHETTO Y. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 933. (55, 85, 89, 92, 105)
- MOSCHETTO Y. et BISERTE G., Réunion Commune des Biochimistes Allemands, Suisses et Français. Strasbourg, (Septembre 1963), conférences n° 71 et 72. (106)
- MOSCHETTO Y., DAUTREVAUX M. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1273. (63, 107)
- MOSCHETTO Y. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1278. (68)
- MOSCHETTO Y., BISERTE G. et PIGACHE P., Colloque "Structure de la Laine", Inst. Text. France, Paris, 1961 p. 121. (47, 161)
- NOPITSCH M., Textil Untersuchungen, Stuttgart, 1951. (162)
- O'DONNELL I.J. et THOMPSON E.O.P., Austr. J. Biol. Sci., 1959, 12, 294. (8, 13, 124)
- O'DONNELL I.J. et THOMPSON E.O.P., Austr. J. Biol. Sci., 1961, 14, 461. (64)
- O'DONNELL I.J. et THOMPSON E.O.P., Austr. J. Biol. Sci., 1964, 17, 973. (108, 109, 110, 111, 129)

- O'DONNELL I.J. et WOODS E.F., J. Polymer. Sci., 1956, 21, 397.
(125)
- PETERSON E.A. et SOBER H.A., Anal. Chem., 1954, 31, 857. (134)
- PHILLIPS D.M.P., Biochem. J., 1958, 68, 35. (148)
- PIEZ K.A. et MORRIS L., Anal. Biochem., 1960, 1, 187. (132, 135)
- PIGACHE P., Thèse d'Ingénieur-Docteur - Université de Lille,
1956, n° 21. (18, 72, 114)
- PIGACHE P. et BISERTE G., Bull. Inst. Text. France, 1951 (Décembre)
37. (118)
- POULIK M.D., Nature, 1957, 180, 1477. (153, 156)
- POULIK M.D., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 44, 390. (154)
- ROGERS G.E., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 83, 378. (25, 29, 49)
- ROGERS G.E., J. Ultrastruct. Res., 1959, 2, 309. (23, 26, 27)
- SANGERS F., Biochem. J., 1945, 39, 507. (142, 147)
- SCHOBERL A., Melliand Textilberichte, 1960, 41, 188. (41)
- SHINOHARA K., J. Biol. Chem., 1936, 112, 671 et 683. (149)
- SIMMONDS D.H., Austr. J. Biol. Sci., 1955, 8, 537. (75)
- SIMMONDS D.H. et BARTULOVICH J.J., Text. Res. J., 1958, 28, 378.
(39, 44)
- SIMMONDS D.H. et STELL I.G., Proc. Int. Wool Textile Res. Conf.,
Australia, 1955, C, 75. (96)
- SMITH A.L. et HARRIS M., J. Research Natl. Bur. Standards,
1936, 16, 301 et 309. (2)
- SMITH A.L. et HARRIS M., J. Res. N.B.S., 1936, 17, 97 et 577.
(2)
- SMITH A.L. et HARRIS M., J. Res. N.B.S., 1937, 18, 623. (2)
- SMITHIES O., Biochem. J., 1955, 61, 629. (152)
- SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S., Anal. Chem., 1958, 30,
1190. (131)
- SPEAKMAN J.B. et DAS D.B., J. Soc. Dy. Col., 1950, 66, 583. (11)

- SPRINGELL P.A., Austr. J. Biol. Sci., 1963, 16, 727. (76)
- SWERDLOW M. et SEEMAN G.S., J. Research Natl. Bur. Standards,
1948, 41, 231. (22)
- THOMPSON E.O.P., Austr. J. Biol. Sci., 1957, 10, 225. (57)
- THOMPSON E.O.P. et O'DONNELL I.J., Austr. J. Biol. Sci.,
1964, 17, 277. (90, 155)
- TISELIUS A., I. Biochem. J., 1937, 31, 313. (150)
- TISELIUS A., Trans. Faraday Soc., 1937, 33, 524. (150)
- TOENNIES G. et HOMILLER R.P., J. Amer. Chem. Soc.,
1942, 64, 3054. (3)
- WARD W.H. et BARTULOVICH J.J., Text. Res. J., 1955, 25, 888.
(38)
- WARD W.H. et BARTULOVICH J.J., J. Phys. Chem., 1956, 60, 1208.
(38)
- WHITAKER J.R., Anal. Chem., 1963, 35, 1950. (157)
- WOODS E.F., Colloque "Structure de la Laine", Institut Textile
de France, PARIS, 1961, p. 143.
(65, 167)

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I</u>	
GENERALITES SUR LA STRUCTURE DES KERATINES DE LA LAINE	4
I - INTRODUCTION	4
II - MORPHOLOGIE DE LA LAINE	4
<u>CHAPITRE II</u>	
SEPARATION DES CONSTITUANTS MORPHOLOGIQUES DE LA LAINE	
ACTION DE LA PEPSINE EN RELATION AVEC LA STRUCTURE MORPHOLOGIQUE DES FIBRES KERATINIQUES	11
I - INTRODUCTION	11
II - RESULTATS EXPERIMENTAUX	14
A) Mise en évidence de l'hétérogénéité du cortex et méthode préparative d' isolement des cellules corticales	14
B) Influence du milieu d'hydrolyse pepsique par la libération des cellules corticales	16
C) Cinétique de l'hydrolyse pepsique	16
D) Cinétique de libération des cellules corticales	16
E) Relation entre la solubilisation du soufre (Thiol + disulfure) et la libé- ration des cellules corticales	20
F) Propriétés des cellules corticales en fonction du taux d'hydrolyse pepsique	20
III - DISCUSSION DES RESULTATS	22
A) Méthode d'isolement de l'orthocortex et du paracortex	22
B) Hydrolyse pepsique en relation avec la structure morphologique de la laine ..	24

C) Relation entre la solubilisation de la cystine et la libération des cellules corticales	27
--	----

CHAPITRE III

COMPARAISON DES S-CARBOXYMETHYLKERATINES EX- TRAITES DES CELLULES CORTICALES ET DE LA LAINE VIERGE	29
I - INTRODUCTION	29
II - FRACTIONNEMENT SUR DEAE-CELLULOSE ET PAR PRECIPITATION	29
A) Fractionnement sur DEAE-cellulose	29
B) Fractionnement par précipitation iso- électrique et acétonique	34
C) Caractérisation chimique de la fraction insoluble à pH 3,9 et purifiée	34
1 ^o) Détermination des groupes α -aminés terminaux libres	34
2 ^o) Détermination de la composition en acides aminés	35
III - METHODE GENERALE DE FRACTIONNEMENT DES SCMK ET D'ISOLEMENT DES SCMK-A	35
A) Fractionnement chromatographique des protéines extraites des cellules orthocorticales	38
1 ^o) Chromatographie des SCMK(OC)	38
2 ^o) Chromatographie des SCMK-A(OC) ...	41
3 ^o) Chromatographie des SCMK-B(OC) ...	41
B) Fractionnement chromatographique des protéines extraites de la laine vierge	41
IV - ETUDE CHIMIQUE DES SCMK	43
A) Etude des protéines extraites des cellules orthocorticales	43
1 ^o) Composition en acides aminés	43
a) SCMK-A(OC)	43
b) SCMK-B(OC)	47
2 ^o) Amino-acides en position N-termi- nale	49

B) Composition des protéines extraites de la laine vierge	49
C) Discussion	49
V - CONCLUSIONS	55

CHAPITRE IV

SITES D'ACTION DE LA PEPSINE AU COURS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES KERATINES	58
I - INTRODUCTION	58
II - ACTION DE LA PEPSINE SUR LES SCMK	58
A) Hydrolyse pepsique des SCMK-A(OC)	58
B) Hydrolyse pepsique des SCMK-B(OC)	59
C) Etude chimique des fragments protéiques des SCMK-A résistant à l'hydrolyse pepsique	60
1 ^o) Composition en amino-acides	60
2 ^o) Amino-acides en position N-terminale	61
III - ACTION DE LA PEPSINE SUR LES KERATINES REDUITES ET REPONTEES	61
IV - ACTION DE LA PEPSINE SUR LA LAINE VIERGE..	70
V - DISCUSSION	72
VI - CONCLUSION	73

CHAPITRE V

ETUDE GENERALE DES PROTEINES CONSTITUTIVES DES KERATINES ISOLEES A L'ETAT DE S-CARBOXYMETHYLKE- RATINES	82
I - INTRODUCTION	82
II - LES CONDITIONS D'EXTRACTION DES KERATINES .	82
III - HETEROGENEITE DE LA FRACTION PAUVRE EN SOUFRE	88
IV - METHODES DE FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES SCMK	90
V - CLASSIFICATION DES S-CARBOXYMETHYLKERATINES DE LA LAINE	95
VI - ISOLEMENT ET PROPRIETES DE QUELQUES SCMK ..	101
VII - ORIGINE DES KERATINES RICHES EN GLYCOCOLLE (SCMK-RG)	106

	A) Introduction	106
	B) Extraction de la laine par la soude N/10	106
	C) Traitements acides	109
	D) Etude chromatographique des SCMK extrai- tes du poil Mohair	112
	E) Discussion	114
	VIII - CONCLUSION	118
<u>CHAPITRE VI</u>		
	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	119
<u>CHAPITRE VII</u>		
	EXPOSE DES TECHNIQUES	127
	I) SUBSTRATS ET REACTIFS	127
(T 1)	A) Laine Mérinos	127
(T 2)	B) Fibre Mohair	128
(T 3)	C) Enzymes	128
(T 4)	D) Réactifs et produits chimiques	128
(T 5)	E) Agents de chromatographie	128
	II) METHODES GENERALES D'ANALYSE	
(T 6)	A) Analyse des acides aminés par la méthode de PIEZ et MORRIS	129
	1) Généralités	129
(T 7)	2) Séparation chromatographique	129
(T 8)	3) Dosage	130
(T 9)	4) Interprétation des résultats	133
(T 10)	5) Conditions d'hydrolyse des protéines	136
(T 11)	B) Dosage des acides aminés totaux par la méthode de LEVY	138
(T 12)	C) Dosage des acides aminés N-terminaux par la méthode de SANGER	139
(T 13)	D) Dosage du soufre thiol et disulfure (Shinohara)	140
(T 14)	E) Dosage de l'azote protéique	142

(T 15)	F) Electrophorèse en veine liquide	143
(T 16)	G) Electrochromatographie : couplage électrophorèse à pH 3,9 + chromatographie	144
(T 17)	H) Electrophorèse en gel d'amidon	145
(T 18)	I) Mesure des mobilités relatives des protéines en gel d'amidon	147
(T 19)	J) Estimation des poids moléculaires par la méthode de gel-filtration	147
(T 20)	K) Ultracentrifugation	148
	III - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SEPARATION DES PROTEINES	149
(T 21)	A) Chromatographie sur DEAE-cellulose	149
(T 22)	B) Réalisation des gradients de concentration pour les éluions chromatographiques	149
(T 23)	C) Fractionnement par chromatographie de filtration sur gel	150
(T 24)	1) Chromatographie sur Sephadex G75 ...	150
(T 25)	2) Chromatographie sur Sephadex G200 ..	152
(T 26)	3) Détermination des volumes d'éluion	153
(T 27)	4) Chromatographie sur Deae-Sephadex ..	154
	IV - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES COMPOSANTS MORPHOLOGIQUES DE LA LAINE	155
(T 28)	A) Hydrolyse pepsique selon BISERTE et al. (158)	155
(T 29)	B) Désagrégation mécanique de la laine hydrolysée par la pepsine	156
(T 30)	C) Hydrolyse pepsique selon MOSCHETTO et al. (161)	156
(T 31)	D) Isolement des cellules corticales	158
(T 32)	E) Purification des cellules orthocorticales	158
(T 33)	F) Purification de la fraction fibreuse paracorticale	159
(T 34)	G) Etude de la cinétique de l'hydrolyse pepsique	159

(T 35)	H)	Estimation pondérale du taux d'hydrolyse	160
(T 36)	I)	Estimation pondérale du taux de libération des cellules corticales	160
(T 37)	J)	Hydrolyse pepsique avec renouvellement quotidien du milieu d'hydrolyse	161
(T 38)	K)	Identification des cellules corticales de la laine à l'aide du bleu lactophénol .	161
(T 39)	L)	Détermination des taux d'extraction par le thioglycolate de potassium	162
V - S-CARBOXYMETHYLKERATINES - PREPARATION - PURIFICATION - HYDROLYSE			163
(T 40)	A)	Préparation des S-carboxyméthylkératines	163
(T 41)	1)	Extraction	163
(T 42)	2)	Carboxyméthylation	163
(T 43)	3)	Test au nitroprussiate de sodium ..	164
(T 44)	B)	Fractionnement des SCMK par précipitation à pH 3,9	165
(T 45)	C)	Purification des SCMK-A par précipitation acétonique	165
(T 46)	D)	Extraction fractionnée des kératines .	166
(T 47)	1)	Extraction à 0°C	166
(T 48)	2)	Extraction à 50°C	166
(T 49)	3)	Extraction à 50°C en présence d'urée 8 M	166
(T 50)	4)	Détermination des taux d'extraction	167
(T 51)	5)	Estimation du taux de protéines riches et pauvres en soufre	167
E) Hydrolyse pepsique des S-carboxyméthylkératines			168
(T 52)	1)	Hydrolyse	168
(T 53)	2)	Détermination du taux d'hydrolyse .	168
(T 54)	3)	Hydrolyse pepsique aux temps courts	169

(T 55) F) Hydrolyse trypsique des S-carboxyméthyl-
kératines 169

VI - METHODES PARTICULIERES

(T 56) A) Extraction des kératines par la soude
N/10 à 50°C 170

(T 57) B) Extraction des kératines par la soude
N/10 à 0°C 171

(T 58) C) Détermination des taux d'extraction
par la soude 171

(T 59) D) Préparation des α -kératoses 171

(T 60) E) Extraction des kératines par l'acide
chlorhydrique 6 N 172

(T 61) F) Extraction des kératines par le
thioglycolate d'ammonium à 0°C 172

(T 62) G) Hydrolyse sulfurique des kératines .. 173

(T 63) H) Hydrolyse pepsique de la laine en
vue de l'analyse de l'hydrolysate 174

(T 64) I) Dosage des amino-acides en vue de
l'analyse des hydrolysats pepsiques . 174

(T 65) J) Préparation des kératines repontées
artificiellement 175

BIBLIOGRAPHIE 176

TABLE DES MATIERES 183

