

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

A L' UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

Par

Edmond JAKUBCZAK

Maître-Assistant à l'École Nationale Supérieure des Industries
Agricoles et Alimentaires

Chef de Service au Centre d'Études et de Recherches
Technologiques des Industries Alimentaires



RECHERCHES SUR LES GLYCOPROTEINES DU BLANC D'ŒUF DE POULE

1° ISOLEMENT ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE :

DE L'OVOINHIBITEUR
DE L'OVOGLYCOPROTEINE
DE LA RIBOFLAVOPROTEINE
DE L'OVOMUCOÏDE

2° RESOLUTION DU PROBLEME DE L'HETEROGENEITE DE L'OVOMUCOÏDE

PRÉSENTÉ LE 24 JUIN 1971, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. M. J. MONTREUIL	Président
G. BISERTE	Rapporteur
C. LOUCHEUX	Examineur
A. BONASTRE	Membre invité
L. PETIT	Membre invité

Ce travail a été effectué dans les laboratoires de l'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES (Centre de DOUAI) et dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES de LILLE.

A la mémoire de mon Père,

Il a été pour moi un exemple de travail de courage et d'honnêteté. Trop tôt disparu, il n'aura pas la joie de connaître ce travail ; modeste ouvrier, il en aurait été fier.

A ma Mère

A ma Femme

A mes Filles

A tous les Miens

en témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à la
Faculté des Sciences de Lille,
Chef de Service de Biochimie Cellulaire de
l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille

Les deux années au cours desquelles j'ai eu le privilège de travailler à vos côtés dans les laboratoires de la rue Gosselet, ont marqué d'une empreinte définitive, l'évolution de ma carrière. Chercheur passionné, vous m'avez montré les attraits de la recherche scientifique ; travailleur infatigable vous m'avez appris à goûter aux joies du travail bien fait ; chercheur scrupuleusement honnête, vous m'avez enseigné la rigueur scientifique.

Je vous suis infiniment reconnaissant de m'avoir communiqué votre foi dans la recherche et de m'avoir formé dans cet esprit d'équipe qui vous est si cher.

A Monsieur le Doyen R. DEFRETIN

Directeur du laboratoire de
Biologie Marine de Wimereux

Etudiant, j'ai pu apprécier le sens profondément humain que vous attachiez à votre métier de Professeur et de Chercheur. Plus tard, vous avez été à l'origine de la situation que j'occupe actuellement à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.

Je ne saurais oublier tout ce que je vous dois et je profite de l'aboutissement de ce travail pour vous exprimer ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur J. CLAVEAU

Professeur de Microbiologie à l'Ecole Nationale Supérieure
des Industries Agricoles et Alimentaires

Avec votre sens très aigu des réalités, votre humeur et votre totale et bienveillante amitié, vous m'avez incité à asservir les devoirs de mon métier aux exigences de la vie quotidienne. Vous avez été pour moi un exemple constant de libéralisme.

Je ne saurais désormais entreprendre un travail, décider d'un comportement sans qu'ils ne soient dans ma conscience, soumis à votre jugement.

A Monsieur A. BONASTRE

Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure
des Industries Agricoles et Alimentaires

En m'accueillant dans votre établissement, vous avez
mis à ma disposition les moyens de réaliser ce travail.

Je vous en remercie vivement et je suis honoré que vous
ayez accepté, aujourd'hui de juger ma thèse.

A Monsieur L. PETIT

Directeur de Recherches à l'Institut National
de la Recherche Agronomique.

Je sais l'intérêt que vous avez porté à ce travail ;
souvent j'ai pu apprécier votre simplicité et votre amabilité. Aussi suis-je
heureux et honoré de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse.

A Messieurs les Professeurs G. BISERTE, Professeur de Biochimie Pathologique
à la Faculté de Médecine de Lille et C. LOUCHEUX Professeur de Chimie
Macromoléculaire à la Faculté des Sciences de Lille qui m'ont fait l'honneur
d'accepter de juger ma thèse.

J'exprime mes plus vifs remerciements :

à tous mes camarades du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille et en particulier à Geneviève SPIK, Pierre CHARET, Michel MONSIGNY et André VERBERT pour leur précieuse collaboration et pour leur constante et souriante amitié.

à Monsieur J.Y. LEVEAU, pour l'aide qu'il a bien voulu nous apporter au cours des périodes de mise au point des procédés de fractionnement chromatographique.

à Madame FILITTI - WURMSER, Station Centrale d'Ultracentrifugation du Centre National de la Recherche Scientifique de Paris, qui a effectué les ultracentrifugations.

à Monsieur P. SECRETIN pour la collaboration technique qu'il a mis au service de ce travail avec intelligence, efficacité et désintéressement. Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude et de notre amitié.

à Mesdames A. DHAINAUT et S. MOUY - LEDOUX, à Monsieur C. MALOLEPSZY qui ont apporté à des titres divers leur contribution à la réalisation de ce mémoire.

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARNOULT, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY, CORDONNIER.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	I.U.T. Lille
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. le Doyen DEFRETIN René	Directeur du Laboratoire de Biologie Maritime de Wimereux
M. DEHORS	Automatique
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Animale
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LIEBAERT	I.U.T. Lille
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	I.U.T. Valenciennes
M. MARTINOT LAGARDE	Mécanique des Fluides
M. PEREZ Jean-Pierre	Physique
M. PHAM MAU QUAN	Mathématiques
M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée E.N.S.C.I.
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale

M. WATERLOT Gérard
M. WERTHEIMER Raymond

Géologie et Minéralogie
Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BENABOU Jean
M. LUCQUIN Michel
M. LEBRUN André
M. PARREAU Michel
M. SAVARD Jean
M. SCHALLER François
M. SCHILTZ René

Mathématiques
Chimie Physique
C.U.E.E.P.
Mathématiques
Chimie Générale
Biologie Animale
Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean
M. BODART Marcel
M. BOUISSET Simon
M. CELET Paul
M. CONSTANT Eugène
M. DELHAYE Michel
M. DERCOURT Jean-Michel
M. DEVRAINNE Pierre
M. GUILLAUME Jean
Mme LENOBLE Jacqueline
M. LINDER Robert
Mlle MARQUET Simone
M. MONTARIOL Frédéric
M. PROUVOST Jean
M. VAILLANT Jean

Physique
Biologie Végétale
Physiologie Animale
Géologie Générale
Electronique
Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
Géologie et Minéralogie
Chimie Minérale
Biologie Végétale
Physique
Biologie Végétale
Mathématiques
Chimie Minérale Appliquée
Géologie et Minéralogie
Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCE (et chargés des fonctions)

M. ABBAR
M. AUBIN Thierry
M. BEGUIN Paul
M. BILLARD Jean
M. BKOUCHE Rudolphe
M. BOILLET Pierre
M. BOILLY Bénoni
M. BONNOT Ernest
M. BRIDOUX Michel
M. CAPURON Alfred
M. CARREZ Christian
M. CHOQUET Marcel
M. CORTOIS Jean
M. COULON Jean-Paul
Mme DRAN Raymonde
M. GOUDMAND Pierre
M. GRUSON Laurent

I.U.T. Amiens
Mathématiques Pures
Mécanique des Fluides
Physique
Mathématiques
Physique
Biologie Animale
Biologie Végétale
I.U.T. Béthune
Biologie Animale
Calcul Numérique
I.U.T. Lille
Physique
Electrotechnique
Chimie Organique
Chimie Physique
Mathématiques

M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY	Biologie Animale
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LAURENT François	Automatique
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	I.U.T. Lille
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Sciences Appliquées
M. MONSIGNY Michel	Chimie Biologique
M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
Mme MORIAEZ BOULLET Claude	I.U.T. Valenciennes
M. NICOLE Jacques	E.N.S.C.L.
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mécanique des Fluides
M. PONSOLLE	C.S.U. Valenciennes
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY	Radioélectrique
M. ROOS Philippe	I.U.T. Lille
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SAADA Georges	Physique
M. SAIMER Georges	Electronique
M. SMET Pierre	Physique
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. THOMAS Daniel	C.S.U. Valenciennes
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINN Justin Nicole	Mathématiques

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
---------------------	---

<u>GENERALITES</u>	5
--------------------	---

LES PROTEIDES DU BLANC D'OEUF

1 - L'OVALBUMINE	5
2 - LA CONALBUMINE	5
3 - LE LYSOZYME	9
4 - L'AVIDINE	9
5 - L'OVOMUCINE	9
6 - LA RIBOFLAVOPROTEINE	10
7 - L'OVONHIBITEUR DE MATSUSHIMA	10
8 - L'OVOLYCOGLYCOPROTEINE DE KETTERER	11
9 - LES GLOBULINES	11
10 - CONSTITUANTS DIVERS	12

L'OVOMUCOÏDE

1 - <u>HISTOIRE DE SA DECOUVERTE</u>	13
I - <u>MISE EN EVIDENCE D'UN PROTEIDE NON COAGULABLE PAR LA CHALEUR DANS LE BLANC D'OEUF.</u>	13
II - <u>MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTRYPSIQUE DU BLANC D'OEUF</u>	14
III - <u>MISE EN EVIDENCE DANS LE BLANC D'OEUF D'UN COMPLEXE GLUCIDE-PROTEIDE.</u>	14
2 - <u>METHODES DE PREPARATION ET DE PURIFICATION.</u>	15
I - <u>METHODES DE PREPARATION</u>	15

A - <u>LES METHODES PAR PRECIPITATION</u>	16
1° - <u>DENATURATION PAR LA CHALEUR</u>	16
a) Méthode de NEUMEISTER	16
b) Procédé de MÖRNER	16
1) Premier procédé	16
2) Deuxième procédé	16
c) Procédé de WERNER et ODIN	16
d) Procédé de LONGSWORTH et coll.	17
2° - <u>DENATURATION PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE</u>	17
a) Méthode de LINEWEAVER et MURRAY	17
b) Méthode de FREDERICQ et DEUTSCH	17
3° - <u>DENATURATION PAR L'ACETONE</u>	17
Méthode de MEYER	17
4° - <u>DENATURATION PAR L'ETHANOL</u>	17
Méthode de FORSYTHE et FOSTER	17
5° - <u>DENATURATION PAR LE PHENOL</u>	18
Méthode de MONTREUIL et coll.	18
B - <u>LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	18
1° - Méthode de RHODES, AZARI et FEENEY	18
2° - Méthode de MANDELES	18
C - <u>CONCLUSIONS</u>	19
II - <u>METHODES DE PURIFICATIONS</u>	19
A - <u>LES METHODES ELECTROPHORETIQUES</u>	20
1° - Travaux de JUTISZ, KAMINSKI et LEGAULT- --DEMARE	20
2° - Travaux d'ADAM-CHOSSON et de MONTREUIL et coll.	20

3° - Conclusion	20
B - <u>LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	20
1° - <u>TRAVAUX DE JEVONS</u>	20
2° - <u>TRAVAUX DE CHATTERJEE ET MONTGOMERY</u>	21
3° - <u>TRAVAUX D'ADAM-CHOSSON ET DE MONTREUIL et coll.</u>	21
4° - <u>TRAVAUX DE KANAMORI et KAWABATA</u>	21
III - <u>CONCLUSIONS</u>	22
3 - <u>PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE L'OVOMUCOÏDE</u>	23
I - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	23
A - <u>SOLUBILITE</u>	23
B - <u>COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE</u>	23
1° - <u>Electrophorèse libre</u>	23
2° - <u>Electrophorèse de zone</u>	24
C - <u>COMPORTEMENT IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE</u>	28
D - <u>DIAGRAMME D'ULTRACENTRIFUGATION, CONSTANTE DE SEDIMENTATION, MASSE MOLECULAIRE</u>	28
E - <u>POINT ISOELECTRIQUE</u>	30
F - <u>PROPRIETES PHYSIQUES DIVERSES</u>	32
II - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	32
A - <u>CHIMIE DU GROUPEMENT GLYCANNIQUE</u>	32
B - <u>CHIMIE DE LA FRACTION PROTEIQUE</u>	38
4 - <u>LA STRUCTURE</u>	40

I - <u>LE GROUPEMENT GLYCANNIQUE</u>	40
II - <u>LE POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE</u>	42
5 - <u>LES PROPRIETES BIOLOGIQUES</u>	44
6 - <u>CONCLUSIONS</u>	49
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	51
<u>INTRODUCTION</u>	52
L'OVOINHIBITEUR DE MATSUSHIMA	
1 - <u>PREPARATION</u>	55
I - <u>APPLICATION DE LA METHODE DE TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVICH</u>	55
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	55
1° - <u>PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA METHODE DE LINEWEAVER ET MURRAY</u>	55
2° - <u>FRACTIONNEMENT DE L' "OVOMUCOÏDE" DE LINEWEAVER ET MURRAY SELON LE PROCEDE DE TOMIMATSU, CLARY ET BARTULOVICH</u>	57
B - <u>RESULTATS.</u>	57
C - <u>CONCLUSIONS</u>	60
II - <u>PROCEDE PERSONNEL DE PURIFICATION DE L'OVOINHIBITEUR OBTENU PAR LA METHODE DE TOMIMATSU, CLARY ET BARTULOVICH</u>	60
A - <u>PRINCIPE</u>	60
B - <u>MODE OPERATOIRE</u>	60

1° - PREMIERE ETAPE : CHROMATOGRAPHIE DE L'OVOINHIBITEUR SUR DEAE-CELLULOSE	60
2° - DEUXIEME ETAPE : CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE	61
C - <u>RESULTATS</u>	61
1° - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE	61
2° - CHROMATOGRAPHIE DU PIC A-DEAE SUR CM-CELLULOSE	64
D - <u>CONCLUSIONS</u>	67
<u>III - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA PREPARATION DE L'OVOINHIBITEUR.</u>	67
2 - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	67
I - <u>ULTRACENTRIFUGATION</u>	67
A - <u>RESULTATS</u>	67
B - <u>CONCLUSIONS</u>	68
II - <u>COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE</u>	68
A - <u>METHODES</u>	68
B - <u>RESULTATS</u>	70
1° - <u>ELECTROPHORESE DE ZONE</u>	70
a - L'électrophorèse sur papier	70
b - Electrophorèse en gélose	70
c - Electrophorèse sur acétate de cellulose.	70
2° - <u>ELECTROFOCALISATION</u>	70
C - <u>CONCLUSIONS</u>	70
<u>III - PROPRIETES OPTIQUES</u>	73
A - <u>ABSORPTION DE LA LUMIERE</u>	73

B - <u>POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE</u>	73
C - <u>CONCLUSIONS</u>	74
3 - <u>COMPOSITION CHIMIQUE</u>	74
I - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES</u>	74
A - <u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>	74
B - <u>COMPOSITION MOLAIRE</u>	76
1° - LES OSES "NEUTRES"	76
2° - L'OSAMINE	79
3° - L'ACIDE SIALIQUE	79
C - <u>CONCLUSIONS</u>	80
II - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	81
A - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES</u>	81
1° - COMPOSITION CENTESIMALE	81
2° - COMPOSITION MOLAIRE	81
B - <u>DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX</u>	81
1° - AMINO-ACIDE N- TERMINAL	81
2° - AMINO-ACIDE C- TERMINAL	84
C - <u>CONCLUSIONS</u>	84
3 - <u>INHIBITION DE LA TRYPSINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE</u>	84
I - <u>INHIBITION DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE DE LA TRYPSINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE</u>	85
A - <u>METHODE</u>	85
B - <u>RESULTATS</u>	86

C - <u>CONCLUSIONS</u>	88
II - <u>INHIBITION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE LA TRYPSINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE</u>	90
A - <u>METHODE</u>	90
B - <u>RESULTATS</u>	90
C - <u>CONCLUSIONS</u>	92
III - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES ET L'OVOINHIBITEUR</u>	92
A - <u>METHODE</u>	92
B - <u>RESULTATS</u>	92
1° - COMPLEXE : OVOINHIBITEUR - TRYPSINE	92
2° - COMPLEXE : OVOINHIBITEUR - CHYMOTRYPSINE	94
3° - COMPLEXE : OVOINHIBITEUR - SUBTILISINE	95
C - <u>CONCLUSIONS</u>	95
IV - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'INHIBITION DES ENZYMES PAR L'OVOINHIBITEUR</u>	97
5 - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE L'OVOINHIBITEUR</u>	98
L'OVOLYCOPROTEINE DE KETTERER	
1 - <u>PREPARATION</u>	99
I - <u>APPLICATION DU PROCEDE ORIGINAL DE KETTERER</u>	99
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	99
1° - PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA METHODE DE FORSYTHE ET FOSTER	99

2° - FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE L'OVOMUCOÏDE DE FORSYTHE ET FOSTER SELON LE PROCEDE DE KETTERER	99
B - <u>RESULTATS.</u>	101
C - <u>CONCLUSIONS</u>	103
II - <u>MODIFICATION DE LA METHODE DE KETTERER</u>	103
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE</u>	103
1° - PRINCIPE	103
2° - MODE OPERATOIRE	106
3° - RESULTATS	106
4° - CONCLUSIONS	109
B - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE</u>	109
1° - PRINCIPE	109
2° - MODE OPERATOIRE	109
3° - RESULTATS	110
4° - CONCLUSIONS	110
C - <u>CONCLUSIONS CONCERNANT LES MODIFICATION DE LA METHODE DE KETTERER</u>	113
III - <u>PROCEDE PERSONNEL</u>	113
A - <u>PRINCIPE</u>	113
B - <u>MODE OPERATOIRE</u>	113
1° - CHROMATOGRAPHIE DE L'OVOMUCOÏDE DE FORSYTHE ET FOSTER SUR DEAE-CELLULOSE	114
2° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA "FRACTION OVOGLYCOPROTEINE"	114
C - <u>RESULTATS</u>	114
1° - CHROMATOGRAPHIE DE L'OVOMUCOÏDE DE FORSYTHE ET FOSTER SUR DEAE-CELLULOSE	114

2° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION "OVOGLYCOPROTEINE"	118
D - <u>CONCLUSIONS</u>	120
IV - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA PREPARATION DE L'OVOGLYCOPROTEINE</u>	123
2 - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	123
I - <u>MASSE MOLECULAIRE</u>	124
A - <u>METHODES</u>	124
1° - <u>DETERMINATION A L'APPROCHE DE L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION</u>	124
2° - <u>DETERMINATION PAR LA METHODE DE SVEDBERG</u>	124
a - Détermination des constantes de sédimen- tation et de diffusion libre	124
b - Détermination du volume spécifique partiel.	124
B - <u>RESULTATS</u>	124
C - <u>CONCLUSIONS</u>	125
II - <u>COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE</u>	125
A - <u>METHODES</u>	126
1° - L'ELECTROPHORESE DE ZONE	126
2° - L'ELECTROFOCALISATION	126
B - <u>RESULTATS</u>	126
C - <u>CONCLUSIONS</u>	128
III - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	128
A - <u>RESULTATS</u>	128
1° - ABSORPTION DE LA LUMIERE	128
2° - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE	130

B - <u>CONCLUSIONS</u>	130
3 - <u>COMPOSITION CHIMIQUE</u>	130
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	131
II - <u>RESULTATS</u>	131
A - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES</u>	131
1° - COMPOSITION CENTESIMALE	131
2° - COMPOSITION MOLAIRE	131
a - Les oses "neutres"	131
b - L'osamine	132
c - L'acide sialique	132
B - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	132
1° - DETERMINATION DES COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES	132
2° - DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- et C- TERMINAUX	134
III - <u>CONCLUSIONS</u>	134
4 - <u>PROPRIETES BIOLOGIQUES</u>	135
I - <u>METHODES</u>	135
II - <u>RESULTATS</u>	135
III - <u>CONCLUSIONS</u>	136
5 - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE L'OVOLYCOPROTEINE</u>	136

LA RIBOFLAVOPROTEINE

1 - <u>PREPARATION</u>	140
I - <u>PREPARATION DE LA RIBOFLAVOPROTEINE</u>	140
A - <u>APPLICATION DE LA METHODE DE RHODES, BENNET et FEENEY</u>	140
1° - PRINCIPE	140
2° - MODE OPERATOIRE	140
3° - RESULTATS	141
4° - CONCLUSIONS	141
B - <u>PROCEDE PERSONNEL DE PURIFICATION DE LA RIBOFLAVOPROTEINE OBTENUE PAR LA METHODE DE RHODES, BENNET et FEENEY</u>	144
1° - PRINCIPE	144
2° - MODE OPERATOIRE	144
3° - RESULTATS	144
4° - CONCLUSIONS	147
II - <u>PREPARATION DE L'APOFLAVOPROTEINE</u>	147
A - <u>PRINCIPE</u>	147
B - <u>MODE OPERATOIRE</u>	147
C - <u>RESULTATS</u>	148
D - <u>CONCLUSIONS</u>	148
III - <u>CONCLUSIONS GENERALES RELATIVES AUX METHODES DE PREPARATION DE LA RIBOFLAVOPROTEINE ET DE L'APOFLAVOPROTEINE</u>	150
2 - <u>PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA FLAVOPROTEINE DU BLANC D'OEUF</u>	151
I - <u>INTRODUCTION</u>	151
II - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	151

A - <u>MASSE MOLECULAIRE</u>	151
1° - METHODES	151
2° - RESULTATS	152
a - Ultracentrifugation	152
b - Méthodes chimiques	152
3° - CONCLUSIONS	155
B - <u>COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE</u>	155
1° - <u>METHODES</u>	155
a - L'électrophorèse de zone	155
b - L'électrofocalisation	155
c - La saturation en riboflavine de la ribo- flavoprotéine et de l'apoflavoprotéine	155
2° - <u>RESULTATS</u>	156
a - Electrophorèse de zone sur acétate de cellulose	156
1-Hétérogénéité électrophorétique de la flavoprotéine	156
2-influence de la riboflavine	156
b - Electrofocalisation	158
3° - <u>CONCLUSIONS</u>	158
C - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	160
1° - <u>ABSORPTION DE LA LUMIERE</u>	160
a - Méthodes	160
b - Résultats	161
2° - <u>POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE</u>	161
a - Méthodes	161
b - Résultats	163

3° - <u>CONCLUSIONS</u>	163
D - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LES PROPRIETES PHYSIQUES DE LA FLAVOPROTEINE DU BLANC D'OEUF</u>	163
III - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	165
A - <u>COMPOSITION DE LA FRACTION GLYCANNIQUE</u>	165
1° - <u>COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES</u>	165
a - Méthodes appliquées	165
1-Les oses "neutres"	165
2-Les osamines	165
3-Les acides sialiques	165
b - Résultats	166
2° - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES HYDROLYSATS NEURAMINIDASIQUES DE LA RIBOFLAVOPROTEINE ET DE L'APOFLAVOPROTEINE</u>	168
a - Méthode appliquée	168
b - Résultats et discussion	168
3° - <u>COMPOSITION MOLAIRE EN GLUCIDES</u>	168
a - Identification des oses constituants le groupement glycannique	168
b - Composition molaire en glucides de la riboflavoproteine	170
4° - <u>CONCLUSIONS</u>	172
B - <u>COMPOSITION DE LA FRACTION PROTIDIQUE</u>	173
1° - <u>DETERMINATION DES COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES</u>	174
a - Méthodes	174
b - Résultats et discussion	174
2° - <u>DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX</u>	177

3° - <u>CONCLUSIONS</u>	177
C - <u>COMPOSITION EN PHOSPHORE</u>	179
1° - <u>METHODES</u>	180
2° - <u>RESULTATS</u>	180
a - Composition centésimale et molaire en phosphore	180
b - Etude électrophorétique de la riboflavo- protéine et de l'apoflavoprotéine déphosphorylées	181
3° - <u>CONCLUSIONS</u>	181
D - <u>COMPOSITION CENTESIMALE EN RIBOFLAVINE DE LA RIBOFLAVO- PROTEINE ET CAPACITE TOTALE DE FIXATION DE LA RIBOFLAVINE.</u>	184
1° - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	184
a - La méthode microbiologique	184
b - La méthode spectrofluorimétrique	184
2° - <u>RESULTATS</u>	184
3° - <u>CONCLUSIONS</u>	185
3 - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE LA FLAVOPROTEINE DU BLANC D'OEUF.</u>	185
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin: 10px 0;">L'OVOMUCOÏDE</div>	
1 - <u>PREPARATION</u>	188
I - <u>PRINCIPE</u>	188
II - <u>MODE OPERATOIRE</u>	188
A - <u>PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA METHODE DE FREDERICQ ET DEUTSCH</u>	188

<u>B - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DES PREPARATIONS</u> <u>D'OVOMUCOÏDE OBTENUES PAR LA METHODE DE FREDERICQ ET DEUTSCH. 190</u>	
III - <u>RESULTATS</u>	190
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	192
2 - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	193
I - <u>METHODES APPLIQUEES</u>	193
II - <u>RESULTATS</u>	193
A - <u>ULTRACENTRIFUGATION</u>	193
B - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	196
1° - ABSORPTION DE LA LUMIERE ULTRA-VIOLETTE	196
2° - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE	196
III - <u>CONCLUSIONS</u>	196
3 - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	197
I - <u>METHODES APPLIQUEES</u>	197
II - <u>COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES</u>	197
A - <u>RESULTATS</u>	197
B - <u>CONCLUSIONS</u>	198
III - <u>COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES</u>	198
A - <u>RESULTATS</u>	198
B - <u>CONCLUSIONS</u>	200
IV - <u>DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX</u>	201
A - <u>RESULTATS</u>	201
1° - IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE N- TERMINAL	201
2° - IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE C- TERMINAL	201

B - <u>CONCLUSIONS</u>	202
4 - <u>PROPRIETES BIOLOGIQUES</u>	202
I - <u>INTRODUCTION ET METHODES APPLIQUEES</u>	202
II - <u>RESULTATS</u>	203
A - <u>MESURE DE L'ACTIVITE ANTI-TRYPSIQUE</u>	203
B - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES ET L'OVOMUCOÏDE</u>	203
III - <u>CONCLUSIONS</u>	203
5 - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE L'OVOMUCOÏDE</u>	206
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> <p>L'HETEROGENEITE DES PREPARATIONS D'OVOMUCOÏDE</p> </div>	
1 - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	208
I - <u>MATERIEL</u>	208
II - <u>METHODES</u>	208
A - <u>ANALYSES BIOLOGIQUES</u>	208
B - <u>ANALYSES ELECTROPHORETIQUES</u>	209
C - <u>ANALYSES IMMUNO-ELECTROPHORETIQUES</u>	209
2 - <u>RESULTATS</u>	209
I - <u>ANALYSES BIOLOGIQUES</u>	209
A - <u>CAPACITE DE FIXATION DE LA RIBOFLAVINE</u>	209
B - <u>INHIBITION DE LA TRYPSINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE</u>	210

C - <u>ACTIVITE LYSANTE VIS-A-VIS D'UNE SUSPENSION DE</u> <u>MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS</u>	210
II - <u>ANALYSES ELECTROPHORETIQUES</u>	213
II - <u>ANALYSES IMMUNO-ELECTROPHORETIQUES</u>	213
III - <u>CONCLUSIONS</u>	218

MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE DE L'OVOMUCOÏDE

1 - <u>ELECTROPHORESES SUR ACETATE DE CELLULOSE</u>	220
2 - <u>ELECTROFOCALISATION</u>	220

FRACTIONNEMENT DE L'OVOMUCOÏDE

1 - <u>PRINCIPE</u>	224
2 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	224
I - <u>FRACTIONNEMENT DE L'OVOMUCOÏDE SUR CM-CELLULOSE</u>	224
II - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT SUR DEAE-CELLULOSE DES FRACTIONS I, II, III et IV</u>	224
A - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION I</u>	224
B - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS II, III et IV</u>	225
3 - <u>RESULTATS</u>	225
I - <u>FRACTIONNEMENT DE L'OVOMUCOÏDE SUR CM-CELLULOSE</u>	225
II - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS I, II, III et IV SUR DEAE-CELLULOSE</u>	227
A - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION I</u>	227

B - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS II, III et IV</u>	227
1° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION II	227
2° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION III	231
3° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION IV	231
4 - <u>CONCLUSIONS</u>	232
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> <p style="margin: 0;">PROPRIETES COMPAREES DES OVOMUCOÏDES</p> </div>	
1 - <u>PROPRIETES ANTI-TRYPSIQUES</u>	235
I - <u>METHODES APPLIQUEES</u>	235
II - <u>RESULTATS</u>	235
A - <u>MESURE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE RESIDUELLE</u>	235
B - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES COMPLEXES OVOMUCOÏDE - TRYPSINE</u>	235
III - <u>CONCLUSIONS</u>	238
2 - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	238
I - <u>METHODES APPLIQUEES</u>	238
II - <u>RESULTATS</u>	238
A - <u>IMMUNO-ELECTROPHORESE ET IMMUNO-DIFFUSION</u>	238
B - <u>ULTRACENTRIFIGATION ET VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL</u>	241
C - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	241
D - <u>POINT ISOELECTRIQUE</u>	241
III - <u>CONCLUSIONS</u>	242
3 - <u>COMPOSITION CHIMIQUE</u>	242

I - <u>METHODES APPLIQUEES</u>	242
A - <u>ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE</u>	242
B - <u>ETUDE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE</u>	242
II - <u>RESULTATS</u>	242
A - <u>ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE</u>	242
B - <u>ETUDE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE</u>	244
1° - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES	244
2° - COMPOSITION MOLAIRE EN GLUCIDES	244
3° - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES HYDROLYSATS NEURAMINIDASIQUES	246
III - <u>CONCLUSIONS</u>	246

DISCUSSION ET CONCLUSIONS CONCERNANT L'HETEROGENEITE DE L'OVOMUCOÏDE

1 - HETEROGENEITE ELECTROPHORETIQUE DE L'OVOMUCOÏDE	248
2 - FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE L'OVOMUCOÏDE	248
3 - LES VARIANTS ALLOGLYCO-HOMOPROTEIQUES DE L'OVOMUCOÏDE	248
4 - DISCUSSION DES RESULTATS DE KANAMORI ET KAWABATA	248
5 - NATURE DE L'HETEROGENEITE ELECTROPHORETIQUE DE L'OVOMUCOÏDE. DISCUSSION DES RESULTATS DE MELAMED	249
6 - ORIGINE DES GLYCOPEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE PRONASIQUE DE L'OVOMUCOÏDE DE FREDERICQ ET DEUTSCH	253
7 - HYPOTHESE SUR L'ORIGINE DES VARIANTS DE L'OVOMUCOÏDE	255

CONCLUSIONS GENERALES

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	264
----------------------	-----

The avian egg is a chemical store house
(ROMANOFF and ROMANOFF)

INTRODUCTION

Les raisons qui incitèrent les premiers chercheurs à étudier la chimie de l'oeuf de Poule furent d'ordre nutritionnel. En effet, l'oeuf de Poule entre pour une part importante dans l'alimentation humaine. Il contient d'ailleurs la plupart des matériaux nécessaires à la vie puisqu'il assure la croissance et le développement de l'embryon de poulet.

Parmi les nombreux protéides qui entrent dans la constitution de l'oeuf de Poule, l'ovomucoïde retient l'attention du chercheur en raison de son importance à la fois historique, biologique et biochimique.

L'histoire de la découverte de l'ovomucoïde se confond avec celle des glycoprotéides. Lorsque, dès le milieu du siècle dernier, on décrit pour la première fois l'existence de glucides liés à des protéines, ce fut à la suite d'études sur le sang et sur le blanc d'oeuf. L'ovomucoïde présent dans le blanc d'oeuf, fut le premier glycoprotéide dont on découvrit la préparation et les propriétés.

Le problème que pose le rôle biologique naturel de l'ovomucoïde offre l'attrait de l'inconnu, car il demeure, aujourd'hui encore, une énigme. Cependant, la propriété que possède l'ovomucoïde d'inactiver la trypsine détermine peut-être sa présence dans l'oeuf au sein duquel il agirait comme un régulateur de l'activité enzymatique de l'embryon. L'étude de son évolution au cours de l'ontogenèse de l'oiseau pourrait apporter quelques informations à ce sujet.

D'autre part, il semble que l'oeuf de chaque espèce d'oiseau contienne un ovomucoïde spécifique du point de vue chimique, mais aussi du point de vue de l'activité antitrypsique (SAMUELY (1) ; RHODES, BENNETT et FEENEY (2) ; STEVENS et FEENEY (3) ; OSUGA et FEENEY (4)). La caractérisation de l'ovomucoïde pourrait donc constituer une clef dans l'identification biochimique des espèces aviaires.

Du point de vue chimique, l'ovomucoïde représente le matériel de choix pour l'étude des propriétés physico-chimiques et de la structure des glycoprotéides. En effet, sa préparation relativement facile et rapide à conduire, fournit des rendements élevés. La simplicité de la composition en

oses (galactose, mannose, N-acétyl glucosamine, acide N-acétylneuraminique) et l'importance de la partie glucidique (25 p.100 de l'ovomucoïde) facilitent l'étude du groupement glycannique.

A l'intérêt particulier de l'étude de la structure chimique de l'ovomucoïde s'ajoute un intérêt plus général. En effet, à la suite des résultats acquis dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille et dans les laboratoires étrangers, MONTREUIL et coll. (5,6) et ADAM-CHOSSON (7) ont émis l'hypothèse qu'il existerait un schéma général de structure des glycoprotéides, que les informations obtenues à propos de l'un d'entre eux pourraient être étendues à d'autres glycoprotéides et que les méthodes d'exploration de la constitution, mises au point pour l'un d'eux, seraient applicables à l'ensemble des glycoprotéides. Cette hypothèse devait se révéler par la suite exacte.

Le but poursuivi dans le laboratoire lillois est l'étude comparée de la structure des glycoprotéides sériques, urinaires et tissulaires d'individus sains et cancéreux. Sur le vaste échiquier que représente ce programme de travail, l'orosomucoïde constitue un pion très important, puisque le dosage dans le plasma humain de ce glycoprotéide permet de suivre l'évolution du rhumatisme articulaire aigu, des endocardites, des maladies inflammatoires, de la tuberculose et du cancer. C'est pourquoi, l'exploration de sa structure avait été entreprise. Malheureusement le plasma ne renferme que 0,5 g d'orosomucoïde par litre et des quantités importantes, qu'il était difficile de se procurer, étaient nécessaires pour mettre au point des techniques d'étude inexistantes. L'orosomucoïde présentant avec l'ovomucoïde de grandes analogies physico-chimiques, l'intérêt des chercheurs lillois s'est dès lors porté sur ce dernier.

Le temps a passé et les résultats se sont accumulés. Ce qui hier était une hypothèse, aujourd'hui est une loi : les glycoprotéides, quelle que soit leur origine peuvent être préparés, étudiés par les mêmes procédés qui conduisent à l'isolement de fragments osidiques et glycopeptidiques communs : (MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (8) ; ADAM-CHOSSON (9)).

Dans le présent mémoire, après avoir décrit les protéides du blanc d'oeuf de Poule, actuellement connus, et exposé l'historique de la découverte de l'ovomucoïde, nous envisagerons successivement les méthodes de préparation et de purification de l'ovomucoïde, ses propriétés physico-chimiques, sa composition, sa structure, son rôle biologique. Nous décrirons ensuite les résultats que nous avons obtenus au cours de nos recherches.

Dans une première partie, nous décrirons les méthodes de préparations et de purification, ainsi que les propriétés physiques, chimiques et immunologiques des protéides qui entrent dans la constitution des préparations d'ovomucoïde. Dans une seconde partie, nous exposerons les procédés que nous avons mis au point pour fractionner l'ovomucoïde "proprement dit". Enfin, nous préciserons les propriétés physico-chimiques des fractions d'ovomucoïde que nous avons obtenues, leur participation respective à l'inhibition tryptique et les perspectives nouvelles qu'elles ouvrent pour l'étude de la structure de l'ovomucoïde.

GENERALITES

I - LES PROTEIDES DU BLANC D'OEUF DE POULE.

II - L'OVOMUCOÏDE.

LES PROTEIDES DU BLANC D'OEUF

Les protéides qui ont été caractérisés dans l'oeuf des oiseaux sont nombreux. Beaucoup ont été isolés, aussi n'entre-t-il pas dans notre intention de les décrire tous en détail. Nous renvoyons sur ce sujet aux revues générales de ROMANOFF et ROMANOFF (10), de WARNER (11), de FEVOLD (12), de MONTREUIL (13, 14), de BISERTE (15) et de PARKINSON (16). Nous nous sommes limité à préciser les principales propriétés physiques, chimiques et biologiques des protéides du blanc d'oeuf de Poule, qui sont en outre résumées dans les Tableaux I (p.6) et II (p.7).

1 - L'OVALBUMINE

L'ovalbumine, découverte par HOFMEISTER (17), en 1890, est le principal constituant protéidique du blanc d'oeuf puisqu'elle représente 60 à 70 p.100 des protéides totaux. Il s'agit d'un phosphoglycoprotéide de poids moléculaire 45 000, dont la fraction polysaccharidique est constituée uniquement de mannose (1,8 p.100) et de N-acétylglucosamine (1,4 p.100) dans les rapports molaires 5:3, respectivement. La constitution du groupement glycanique a été explorée par MONTGOMERY, WU et LEE (18,19) qui ont proposé le schéma de structure illustré par la figure 1 (p. 8). Quant à la nature du point d'attache glycanne-protéine, plusieurs auteurs (JOHANSEN, MARSHALL et NEUBERGER (20) ; LEE et MONTGOMERY (21) ; NUENKE et CUNNINGHAM (22,23) ; YAMASHIMA et IZUMI (24) ; YAMASHIMA et MAKINO (25)) ont démontré que la N-acétylglucosamine était conjuguée à l'asparagine par une liaison du type 1-(β -N-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine (Figure 2 ; p.8). Enfin, l'hétérogénéité électrophorétique de l'ovalbumine qui se dissocie en 3 constituants A₁, A₂ et A₃, s'explique par l'absence (A₁) ou la présence de 1 (A₂) ou 2 (A₃) restes "phosphoryle" greffés sur la molécule glycoprotéidique.

2 - LA CONALBUMINE

La conalbumine, découverte en 1900 par OSBORNE et CAMPBELL (26) est un protéide d'un poids moléculaire de 87 000 qui possède la remarquable propriété de complexer les métaux (2 atomes par molécule de conalbumine) comme le fer, le cuivre, le zinc. Selon WINDLE, WIERSEMA, CLARK et FEENEY (27) qui ont exploré le métaloprotéide à l'aide de la résonance paramagnétique électronique, les atomes de Fer (Fe⁺⁺⁺) seraient coordonnés aux atomes

Tableau 1.

Les protéides du blanc d'oeuf de poule.

	p.100 des protéines totales	Propriétés particulières.
Glycoprotéides		
Avidine	0,1	Facteur antibiotine
Conalbumine	9 à 16,8	Complexé les métaux
"Globuline A ₁ "	0,5	
"Globuline A ₂ "	0,5	
"Globuline G ₂ "	4,6	
"Globuline G ₃ "	4,3	
Ovalbumine	60 à 60,5	
Ovoglycoprotéine de KETTERER (28)	?	?
Ovoinhibiteur de MATSUSHIMA (29)	0,1	Inhibe la trypsine, la chymotrypsine et des enzymes protéolytiques microbiennes.
Ovomacroglobuline (C-18) de MILLER & FEENEY (30)	?	
Ovomucoïde (ovomucoïde α de MEYER) (31)	9,2 à 14	Inhibe la trypsine
Ovomucine (ovomucoïde β de MEYER) (32)	1,1 à 1,9	Inhibe l'hémagglutination des hématies par le virus de l'Influenza type B.
Riboflavoprotéine	0,8	?
Holoprotéides		
Inhibiteur de FOSSUM & WHITAKER (33)	?	Inhibe la Ficine et la papaïne.
Lysozyme ("globuline G ₁ ")	2,8 à 3,7	Lyse les bactéries.

Tableau II

Compositions centésimale et molaire en glucides de quelques glycoprotéides du blanc d'oeuf de Poule.

	Hexoses p.100	Osamines p. 100	Acides sialiques p. 100	Composition.
Avidine A (a)	4,7	4		mannose
Avidine NA (a)	3,8	4,5		mannose, acide désoxyribonucléique.
Avidine XA (a)	7,2	3,6		galactose, mannose.
Chalazes		11,4(b)(c)	2,3(d)	
Conalbumine (e)	0,8	1,4		mannose, N-acétylglucosamine (4:8).
Coquille (matrice protéique)*(f)	3,57	5,83		galactose, mannose, fucose, glucosamine, galactosamine.
"Cuticule" (f)	2,87	3,06		galactose, mannose, fucose, hexosamine.
Membranes (f)	1,97	1,45		galactose, mannose, hexosamine.
Ovalbumine (g) (h)	1,8	1,4		mannose, N-acétylglucosamine (5:3).
Ovoglycoprotéine (i)	13,6	13,8	3	galactose, mannose (1:2) ; N-acétylglucosamine, acide N-acétylneuraminique.
Ovoinhibiteur (j)	3,5	2,7		
Ovomacroglobuline (k)	3,5	5,2	< 0,03	
Ovomucine (l)	10,7	13,9	8,7	galactose, mannose, glucosamine, galactosamine, acide N-acétylneuraminique.
Ovomucoïde (m)	8,5à9,5	14,5à15,3	0,8 à 1	galactose, mannose, N-acétylglucosamine, acide N-acétylneuraminique. (2 : 10 : 20 : 1).

* : La matrice protéique de la coquille contient en outre 1,45 p.100 d'acides uroniques. (f)

(a) : FRAENKEL - CONRAT, SNELL et DUCAY (34) ; (b) : YOUNG (35) ; (c) : LEYER (36) ; (d) : FEENEY, RHODES et ANDERSON (37) ;
(e) : WILLIAMS (38) ; (f) : BAKER et BALCH (39) ; (g) NEUBERGER (40) ; (h) : SÖRENSEN (41) ; (i) : KETTERER (42) ; (j) : TOMIMATSU,
CLARY et BARTULOVICH (43) ; (k) : MILLER et FEENEY (44) ; (l) : ROBINSON et MONSEY (45) ; (m) MONTREUIL et coll. (46).

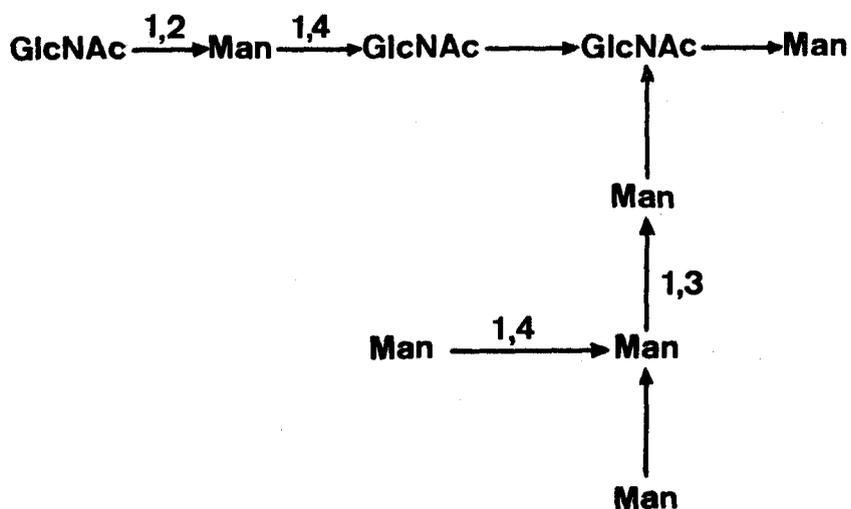


Figure 1

Schéma de structure du glycanne de l'ovalbumine proposé par
MONTGOMERY, WU et LEE (47).

Man : mannose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine.

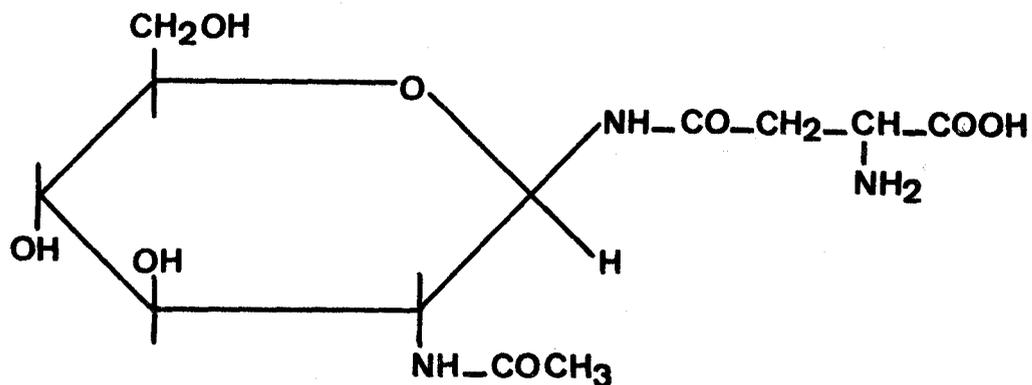


Figure 2

Formule de la 1-(β -N-aspartyl)-N-acétyl-glucosaminylamine.

d'oxygène des groupements phénoliques de 3 résidus de tyrosine, à deux atomes d'azote et à un ion "bicarbonate".

Récemment, on a reconnu la nature glycoprotéidique de la conalbumine dont le glycanne est constitué de 4 résidus de mannose et de 8 résidus de N-acétyl glucosamine (WILLIAMS) (48).

3 - LE LYSOZYME

Le lysozyme, découvert par FLEMING (49) en 1922, est un holoprotéide cristallisable de poids moléculaire 14 800. Sa dénomination est liée à son pouvoir de lyse des bactéries et l'on sait, à présent, grâce aux travaux de GHUYSEN et de JEANLOZ que son action lytique s'explique par son activité N-acétyl neuraminidasiqⁿⁱue qui provoque la dégradation de la "muréïne", constituant glycoprotéidique des parois bactériennes. Le lysozyme possède un point isoélectrique voisin de 11. Sa structure est à présent connue grâce aux remarquables travaux de JOLLES.

4 - L'AVIDINE

L'avidine est un glycoprotéide qui a été isolé, en 1941, par EAKIN, SNELL et WILLIAMS (50). Elle existe sous trois formes : l'avidine A (P.M. : 68 000) de nature glycoprotéidique ; l'avidine XA qui résulte de l'association de l'avidine A avec un glycoprotéide acide ; l'avidine NA (P.M. : 66 000) qui est un complexe insoluble dans l'eau d'avidine A et d'acide désoxyribonucléique. La composition en acides aminés et en oses a été déterminée par MELAMED et GREEN (51).

L'avidine possède la propriété de se complexer avec la biotine (3 molécules de biotine par molécule d'avidine).

5 - L'OVOMUCINE

L'ovomucine ou ovomucoïde de MEYER a été décrite pour la première fois par EICHHOLZ (52). Il s'agit d'un composé très mal défini, de nature glycoprotéidique et de poids moléculaire élevé $7,6 \times 10^6$. Elle précipite par dilution du blanc d'oeuf avec l'eau et devient alors complètement insoluble. Ce dernier caractère explique que les propriétés physico-chimiques de l'ovomucine demeurent très mal connues malgré sa propriété d'inhiber l'hémagglutination des hématies par le virus de l'influenza type B.

Cependant la composition en oses a été récemment précisée par ROBINSON et MONSEY (53).

6 - LA RIBOFLAVOPROTEINE

RHODES, AZARI et FEENEY (54) ont isolé une riboflavoprotéine et son apoprotéine correspondante, par chromatographie des protéides du blanc d'oeuf sur des colonnes de cellulose modifiée (voir p.140).

C'est un protéide de poids moléculaire 32 000 qui contient 0,8 p. 100 de phosphore.

La chromatographie sur CM-cellulose permet de fractionner l'apoprotéine en deux constituants qui sont élués, l'un à pH 4,3 et l'autre à pH 4,5.

En électrophorèse libre à pH 8,6 (tampon véronal) l'apoprotéine native et le mélange des deux sous-fractions sont homogènes. Cependant à pH 4,1 (tampon acétate ; μ 0,1) les deux fractions du mélange se dissocient. Cette hétérogénéité électrophorétique et chromatographique serait liée à la présence de 7 et 8 résidus "phosphoryle" dans les apoprotéines éluées à pH 4,3 et 4,5 respectivement.

7 - L'OVONHIBITEUR DE MATSUSHIMA

MATSUSHIMA (55,56), en 1958, a isolé du blanc d'oeuf, par relargage au sulfate d'ammonium et fractionnement par l'acide trichloracétique et l'acétone un inhibiteur tryptique, différent de l'ovomucoïde et qu'il a nommé ovoinhibiteur (voir p.55). Ses principales propriétés physico-chimiques décrites par TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVITCH (57), sont les suivantes :

Masse Moléculaire

par sédimentation (Archibald)	44 000
par diffusion de la lumière	49 000

Composition Chimique

Azote	: 15,4 p. 100
Hexoses	: 3,5 p. 100
Hexosamines	: 2,7 p. 100

En électrophorèse à haute tension, en gel d'amidon et à pH alcalin, l'ovoinhibiteur possède un comportement intermédiaire entre celui de la conalbumine et de l'ovomucoïde. En outre, il se dissocie en trois constituants. L'ovoinhibiteur inhibe la trypsine, la chymotrypsine et des enzymes protéolytiques d'origine bactérienne et fongique.

Plus récemment DAVIS, ZAHNLEY et DONOVAN (58) ont fractionné l'ovoinhibiteur en 5 composants qui possèdent tous les mêmes propriétés physiques, des compositions en acides aminés identiques, mais se distinguent les uns des autres par leur composition centésimale en glucides. Les résultats obtenus par ces auteurs seront précisés dans nos travaux personnels.

8 - L'OVOLYCOPROTEINE DE KETTERER

KETTERER (59,60) a récemment décrit un procédé d'isolement (voir p.99) à partir de préparations d'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER, d'un nouveau glycoprotéide qu'il a appelé ovoglycoprotéine. Ce composé existe dans la proportion de 1 p. 100 dans le blanc d'oeuf. Ses caractéristiques sont les suivantes :

S_{20w}	:	2,47 S
P.M.	:	24 400
pH_i	:	environ 3,9
Hexoses	:	13,6 p.100 (galactose - mannose : 1:2)
Glucosamine	:	13,8 p.100
Ac. N-acétylneuraminique	:	3 p.100

Ce composé est hétérogène en électrophorèse et se dissocie en deux constituants à pH 3,9 (tampon acétate). Il ne possède pas d'activité anti-trypsique.

9 - LES GLOBULINES

Des globulines G_1 , G_2 et G_3 , ont été caractérisées par HEKTOEN et COLE (61) et par LONGSWORTH, CANNAN et Mc INNES (62). La globuline G_1 a été identifiée au lysozyme par ALDERTON, WARD et FEVOLD (63). Quant aux globulines G_2 et G_3 , il s'agit de glycoprotéides qui contiennent du mannose et une hexosamine et qui n'ont pas encore été identifiés.

Elles ont fait l'objet des recherches immunoelectrophorétiques de KAMINSKI (64,65) qui a décelé 9 espèces de globulines.

En 1963, au cours de travaux de génétique, FEENEY et coll. (66) ont isolé du blanc d'oeuf deux globulines A₁ et A₂ qui sont des variantes génétiques. Leurs propriétés physico-chimiques n'ont pas été précisées. Enfin, en 1966, MILLER et FEENEY (67) ont décrit la préparation, la purification et les principales propriétés physiques et chimiques d'une globuline C₁₈ qu'ils proposent d'appeler OVOMACRO GLOBULINE. Cette globuline présente des réactions immunologiques croisées avec le constituant C₁₈ d'autres espèces aviaires.

10 - CONSTITUANTS DIVERS.

1 - Un inhibiteur de la ficine et de la papaïne a été isolé du blanc d'oeuf en 1968 par FOSSUM et WHITAKER (68) par relargage au sulfate d'ammonium, filtration sur Sephadex G 75 et chromatographie sur CM-cellulose. C'est un holoprotéide de poids moléculaire 12 700 qui n'inhibe ni la trypsine, ni la chymotrypsine, ni des enzymes protéolytiques extraits de Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Bacillus cereus et Bacillus subtilis.

2 - Les chalazes, la membrane qui tapisse la face interne de la coquille, la cuticule qui en recouvre la face externe, la matrice protéique de la coquille sont de nature glycoprotéidique (Tableau II ; p.7).

3 - Des enzymes ont été mis en évidence dans le blanc d'oeuf (tributyrylase, catalase, peptidase, trypsine) par LINEWEAVER, MORRIS, KLINE et BEAN (69). Elles n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies.

4 - Un mucopolysaccharide acide (l'héparine sulfate) a été isolé du blanc d'oeuf en 1966 par LOVELL, SCHORAN et CURRAN (70).

L'OVOMUCOÏDE (pseudopeptone de NEUSMEISTER, ovomucoïde α de MEYER) qui a fait l'objet de notre étude est un glycoprotéide dont nous exposerons à présent les propriétés après avoir toutefois décrit l'historique de sa découverte.

L ' OVOMUCOÏDE

1 - HISTOIRE DE SA DECOUVERTE

La découverte de l'ovomucoïde s'est faite en 3 étapes :

I - MISE EN EVIDENCE D'UN PROTEIDE NON COAGULABLE PAR LA CHALEUR DANS LE BLANC D'OEUF.

La découverte de l'ovomucoïde est classiquement attribuée à MÖRNER (71), cependant nos recherches bibliographiques nous conduisent, sans ambiguïté, à conférer l'antériorité de cette découverte à NEUMEISTER (72) qui, dès 1890, non seulement caractérisait, mais isolait une "pseudopeptone" du filtrat de solutions de blanc d'oeuf portées à l'ébullition et en décrivait les principales propriétés qui sont celles de l'ovomucoïde. Cependant, quel que soit l'"inventeur" de l'ovomucoïde, de nombreux travaux sur les protéides de l'oeuf avaient précédé les siens et lui avaient ouvert la voie.

Vers la fin du siècle dernier, on croyait encore que le blanc d'oeuf ne contenait qu'une seule protéine mais bientôt, l'hétérogénéité de sa composition fut démontrée.

En 1873, BECHAMP (73) caractérisera, en effet, trois protéides distincts ; deux sont précipitables par l'éthanol dilué, tandis que le troisième reste en solution. L'existence de ce dernier composé fut vérifiée plus tard par MÖRNER (74), EICHHOLZ (75), OSBORNE et CAMPBELL (76) et LANGSTEIN (77) et on sait à présent qu'il s'agissait de l'ovomucoïde.

L'année suivante, GAUTIER (78) démontrait que le blanc d'oeuf renfermait deux protéides non coagulables par la chaleur.

En 1888-1889, CORIN et BERARD (79) qui avaient précédemment signalé la présence d'une "peptone" dans le blanc d'oeuf, fractionnent ce dernier et y trouvent cinq protéides qu'ils appellent albumines α , β et γ et ovoglobulines α et β .

En 1890, NEUMEISTER (80) s'inspirant des travaux de ces derniers auteurs, prépare une pseudopeptone, différente disait-il de l'ovalbumine et de l'ovoglobuline.

En 1892, HEWLETT (81) reprend et critique les travaux de HAYCRAFT et DUGGAN (82), eux-mêmes suggérés par ceux de HALLIBURTON (83) concernant la précipitation des protéines sériques par la chaleur. Il effectue une étude

systématique des conditions de fractionnement des protéides de l'oeuf par la chaleur et caractérise au moins trois composants.

En 1894, MÖRNER (84) utilise un procédé analogue à celui qu'avait employé NEUMEISTER quatre ans auparavant et isole un "mucoïde" du filtrat de blanc d'oeuf bouilli.

A ce protéide non coagulable par la chaleur, MÖRNER donna le nom d'OVOMUCOÏDE.

Plus tard, ce terme fut appliqué, d'une manière générale, aux composés qui restaient en solution dans les filtrats acétoniques (MEYER (85)), acétono-trichloracétique (LINEWEAVER et MURRAY (86)), trichloracétique (FREDERICQ et DEUTSCH (87)), éthanolique (FORSYTHE et FOSTER (88)), et phénolique (MONTREUIL et coll. (89)).

II - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTITRYPSIQUE DU BLANC D'OEUF.

L'activité antitrypsique du blanc d'oeuf a été reconnue pour la première fois par DELEZENNE et POZERSKI (90) en 1903 et par HEDIN (91) en 1907.

En 1934-1936, BALLS et SWENSON (92) et MEYER et coll. (93) isolèrent la substance active. Seulement onze ans plus tard, LINEWEAVER et MURRAY (94) identifièrent l'inhibiteur trypsinique à l'ovomucoïde. Depuis, cette propriété a été utilisée par la plupart des auteurs comme critère d'identification et de pureté des préparations d'ovomucoïde.

Pourtant, l'ovomucoïde n'est pas la seule substance antitrypsique présente dans le blanc d'oeuf. L'ovoinhibiteur isolé par MATSUSHIMA (95) en 1958, possède aussi cette propriété.

III - MISE EN EVIDENCE DANS LE BLANC D'OEUF D'UN COMPLEXE GLUCIDE-PROTEINE

La présence de glucides liés aux protéides du blanc d'oeuf a été démontrée par PAVY en 1894 (96) : l'hydrolyse sulfurique détache en effet du coagulum des protéides de l'oeuf dénaturés par la chaleur, une substance qui réduit la liqueur de FEHLING et donne l'osazone du glucose (P.F. : 189-192)*.

(*) P.F. = Point de fusion.

PAVY classa ces protéidos parmi les glucosides conformément à l'opinion déjà exprimée en 1885 par KRUKENBERG (97).

En 1896, KRAWKOW (98) obtient, lui aussi, une osazone, à partir des hydrolysats de blanc d'oeuf coagulé par la chaleur, mais conclut que le glucide n'était pas du glucose, que l'osazone n'était qu'un artefact et que "le résultat obtenu était sans importance du point de vue du métabolisme des glucides".

Cependant, EICHHOLZ en 1898 (99) impressionné par les résultats de PAVY et par ceux de SCHUTZENBERGER (100) qui avaient observé la présence d'une substance réductrice non azotée dans les produits de décomposition des protéides, reprit les travaux de KRAWKOW et identifia la glucosazone, par son point de fusion, dans les produits d'hydrolyse sulfurique d'une préparation d'OVO-MUCOÏDE. A la suite de l'identification de la glucosamine et d'acide sulfurique dans les produits d'hydrolyse de l'ovomucoïde, l'hypothèse fut admise que ce dernier contenait un mucopolysaccharide acide associé par une liaison ionique labile à une protéine, mais elle fut infirmée dès 1900 par LEVENE (101). On admit donc que le groupement polyosidique était neutre et constitué d'oses et d'osamines mais aucune preuve ne pouvait être apportée qu'il fût lié à une protéine. Les préparations d'ovomucoïde pouvaient donc parfaitement résulter du mélange d'un polyoside et d'une protéine.

En 1929 seulement, LEVENE et MORI (102) démontrèrent que les glucides sont énergiquement liés à la protéine et que seule une hydrolyse sodique réalisée à chaud selon le procédé de FRAENKEL et JELLINEK (103) peut dissocier la combinaison, et les auteurs conclurent "that this result indicates the existence of an intimate union between proteins and polysaccharide, one more intimate than that of ions of an ionizable salt".

Plus tard, la nature glycoprotéinique de l'ovomucoïde fut définitivement établie. En effet, il ne pouvait s'agir d'un mélange de polyosides et de protéines dont la séparation aurait été aisée en appliquant les méthodes modernes d'analyse chromatographique ou électrophorétique.

2 - METHODES DE PREPARATION ET DE PURIFICATION.

I - METHODES DE PREPARATION.

Depuis sa découverte, de nombreux procédés ont été décrits pour la préparation de l'ovomucoïde. Nous distinguerons les méthodes par précipitation des méthodes chromatographiques en nous limitant à l'exposé de leur principe.

A - LES METHODES PAR PRECIPITATION

Toutes sont fondées sur la grande stabilité de l'ovomucoïde qui n'est dénaturé ni par la chaleur, ni par l'acide trichloracétique, ni par l'éthanol, ni par l'acétone, ni par le phénol. A cet égard, son comportement est voisin de celui de l'orosomucoïde, séromucoïde₁ du sang de l'Homme. Suivant le procédé de dénaturation employé pour éliminer les autres protéides du blanc d'oeuf, nous distinguerons cinq groupes de méthodes.

1° - DENATURATION PAR LA CHALEUR

a) Méthode de NEUMEISTER (104)

Le blanc d'oeuf est additionné de 3 volumes d'eau distillée, ajusté à pH 6 avec de l'acide chlorhydrique 2 N et porté à ébullition pendant 5 mn sous agitation. Le filtrat est saturé en sulfate d'ammonium à pH 4,6. Le précipité est dissous dans de l'eau distillée et l'ovomucoïde est précipité de cette solution par addition de 5 volumes d'éthanol absolu.

b) Procédés de MÖRNER (105)

1) Premier procédé : Le blanc d'oeuf est porté à l'ébullition dans des conditions identiques aux précédentes. Le filtrat est précipité après concentration de moitié, par de l'éthanol absolu et le précipité est soumis à une nouvelle précipitation alcoolique (4 heures de contact à -8°C). Le précipité final constitue "l'ovomucoïde de MÖRNER I".

2) Deuxième procédé : Le filtrat d'ébullition du blanc d'oeuf, traité dans les mêmes conditions que précédemment, est saturé en sulfate de sodium à pH 7,5 et porté à l'ébullition pendant deux minutes. Le précipité gommeux formé est traité par l'eau distillée. Le filtrat est précipité par cinq volumes d'éthanol absolu (4 heures de contact à + 20°C) et le précipité fournit "l'ovomucoïde de MÖRNER II".

c) Procédé de WERNER et ODIN (106)

Le blanc d'oeuf, dilué avec quatre volumes d'eau, est ajusté à pH 4,7 avec de l'acide chlorhydrique 1 N et maintenu à l'ébullition pendant 3 à 4 heures sous agitation dans un appareil muni d'un réfrigérant à reflux. Le filtrat est concentré au sixième de son volume et précipité par six volumes d'éthanol à -15°C. Après un contact de quatre heures à - 8°C, on recueille un précipité qui est soumis deux fois encore au même fractionnement éthanolique. Le précipité final représente "l'ovomucoïde de WERNER et ODIN".

d) Procédé de LONGSWORTH et coll. (107)

Le blanc d'oeuf, dilué au demi avec de l'eau distillée, est précipité par du sulfate d'ammonium (concentration finale : 133 g pour deux litres) à pH 4,6. Le filtrat est saturé en sulfate d'ammonium et, après un contact d'une nuit, on recueille un précipité qui est dissous dans l'eau et porté à l'ébullition pendant 15 minutes. Le filtrat est dialysé et concentré. Sa précipitation à pH 4,4 et à 0°C par deux volumes d'éthanol conduit à "l'ovomucoïde de LONGSWORTH et coll."

2° - DENATURATION PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUEa) Méthode de LINEWEAVER et MURRAY (108)

Une solution d'acide trichloracétique et d'acétone dénature les protéides accompagnant l'ovomucoïde qui est isolé du filtrat par précipitation acétonique.

Le protocole détaillé est schématisé dans la figure 12 (p. 56).

b) Méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (109)

Les protéides de l'oeuf sont dénaturés par l'acide trichloracétique, et l'ovomucoïde est isolé du filtrat par plusieurs précipitations éthanoliques dans des conditions de température, de pH, de concentration alcoolique et de force ionique suivant le schéma de la figure 52 (p.189).

3° - DENATURATION PAR L'ACETONEMéthode de MEYER (110)

Le blanc d'oeuf est traité par l'acétone et le précipité obtenu est extrait par une solution aqueuse d'éthanol et d'acide acétique. L'ovomucoïde est précipité de l'extrait par l'addition de cinq volumes d'éthanol à - 20°C.

4° - DENATURATION PAR L'ETHANOLMéthode de FORSYTHE et FOSTER (111)

Les protéides du blanc d'oeuf sont fractionnés par l'éthanol selon le schéma de la figure 26 (p.100), fondé sur le principe de la méthode de fractionnement des protéides sériques de COHN et coll. (112).

L'ovomucoïde précipite lorsque la concentration en alcool atteint
70 p. 100.

5° - DENATURATION PAR LE PHENOLMéthode de MONTREUIL et coll. (113)

Ces auteurs ont appliqué à la préparation de l'ovomucoïde, la méthode de MICHON (114) de préparation de l'orosomucoïde. Les protéides du blanc d'oeuf sont dénaturés par le phénol. L'ovomucoïde est précipité du filtrat perchlorique par le sulfate d'ammonium. Il est ensuite purifié par un fractionnement éthanolique.

B - LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

L'application à l'isolement de l'ovomucoïde des méthodes modernes de chromatographie sur des colonnes d'échangeurs d'ions n'a fait l'objet, jusqu'à présent, que d'un très petit nombre de travaux. Des recherches ont été effectuées principalement sur des celluloses modifiées (CM et DEAE - cellulose)* .

En 1958, RHODES, AZARI et FEENEY (115) ont fractionné le blanc d'oeuf sur CM-cellulose équilibrée dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 4,3. L'ovomucoïde n'est pas retenu par l'échangeur de cations. Il est élué le premier dans le tampon de stabilisation et soumis à un deuxième fractionnement effectué sur la même résine, à l'aide d'un gradient d'élution discontinu en acétate d'ammonium de pH 3,5 à 5,5.

Plus récemment, RHODES, BENNETT et FEENEY (116) et FEENEY, STEVENS et OSUGA (117) ont appliqué cette méthode au fractionnement des protéides du blanc d'oeuf de diverses espèces d'oiseaux et ont étudié l'activité antitrypsique des ovomucoïdes ainsi obtenus.

En 1960, MANDELES (118) a utilisé la DEAE-cellulose et fractionné le blanc d'oeuf par un gradient d'élution continu de phosphate de potassium, de glyocolle, de chlorure de sodium et d'acide chlorhydrique. La présence d'ovomucoïde a été décelée dans le pic E par son activité antitrypsique.

* CM-cellulose : carboxy-méthylcellulose.

DEAE-cellulose : diéthylaminoéthyl-cellulose.

C - CONCLUSIONS

Malgré la très grande diversité des méthodes décrites pour l'isolement de l'ovomucoïde, très peu de recherches ont été effectuées pour vérifier la pureté des préparations en dehors de leur activité antitrypsique.

LONGSWORTH et coll. (119) les premiers, puis LINEWEAVER et MURRAY (120) et FREDERICQ et DEUTSCH (121) avaient remarqué l'hétérogénéité électrophorétique de leurs préparations.

En 1953, BIER et coll. (122) ont repris l'étude électrophorétique détaillée des préparations obtenues par ces deux derniers groupes de chercheurs et sont arrivés à la conclusion que ce que l'on considérait, en général, comme l'ovomucoïde, serait en fait un complexe formé de cinq protéides très semblables, tous doués d'activité antitrypsique ne présentant entre eux qu'une faible différence d'un groupe chargé en plus ou en moins par exemple.

En 1957, JUTISZ, KAMINSKI et LEGAULT-DEMARE (123) montrent au moyen de l'analyse immunoélectrophorétique que les préparations obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY et de FREDERICQ et DEUTSCH contiennent des impuretés (lysozyme et β -globulines).

En 1958, RHODES, AZARI et FEENEY (124) signalent que leurs préparations sont souillées par des globulines, mais qu'aucun autre protéide du blanc d'oeuf n'était décelable par la recherche des activités spécifiques.

L'homogénéité des préparations d'ovomucoïde était donc douteuse ; or l'étude de la structure chimique d'un composé ne tolère pas une telle incertitude. C'est pourquoi quelques essais de purification ont été tentés.

II - METHODES DE PURIFICATION.

Les tentatives de purification de l'ovomucoïde ont porté essentiellement sur les préparations obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY (125) et de FREDERICQ et DEUTSCH (126).

Les méthodes utilisées se rattachent à l'électrophorèse de zone sur poudre de cellulose dans des colonnes de type PORATH et au fractionnement chromatographique sur des colonnes de cellulose modifiée échangeuse d'anions (TEAE et DEAE-cellulose)* et échangeuse de cations (SE-cellulose)**, sur des colonnes d'hydroxylapatite et sur des colonnes de Sephadex.

* TEAE-cellulose : triéthylaminoéthyl-cellulose

** SE-cellulose : sulfo-éthyl-cellulose.

A - LES METHODES ELECTROPHORETIQUES

1° - En 1957, JUTISZ, KAMINSKI et LEGAULT-DEMARE (127) ont effectué des électrophorèses préparatives sur l'ovomucoïde de LINEWEAVER et MURRAY, dans un tampon acétate 0,1 M de pH 6 sous une tension de 160 volts pendant 42 heures.

Les auteurs ont ainsi séparé six fractions : A, B, C, C₂, C₃, et D.

L'analyse immuno-électrophorétique montre que la fraction D est constituée par le lysozyme et une globuline β_3 ; quant à la fraction C₂, pondéralement la plus importante (49,1 p. 100 des protéines totales récupérées), elle est homogène ; soumise à une deuxième électrophorèse dans les mêmes conditions, puis à une troisième dans un tampon acétate 0,1 M de pH 4,4 sous une tension de 192 volts pendant 70 heures, le constituant C₂ ne donne qu'un seul pic d'éluion.

Sur les six fractions obtenues, seule la fraction C₂ possède une activité antitrypsique.

Ces résultats confirment l'hétérogénéité des préparations d'ovomucoïde étudiées par les auteurs mais sont en désaccord total avec les conclusions de BIER et coll. (128) concernant l'activité antitrypsique.

2° - En 1964-1965, ADAM-CHOSSON (129) et MONTREUIL et coll. (130), ont appliqué une méthode semblable à la purification de préparations d'ovomucoïde obtenues par divers procédés.

Les électrophorèses ont été réalisées dans un tampon phosphate 0,005 M de pH 7,4 et sous des tensions variant de 400 à 1200 volts pendant 16 à 17 heures.

En aucun cas, les auteurs n'ont pu obtenir un ovomucoïde immuno-électrophorétiquement homogène.

3° - CONCLUSION :

Les résultats acquis par les différents auteurs révèlent un désaccord profond dont les raisons sont restées inexplicées.

B - LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

1° - En 1960, JEVONS (131) fractionne les ovomucoïdes de LINEWEAVER et MURRAY (132) et de FREDERICQ et DEUTSCH (133) sur TEAE-cellulose. Il applique

un gradient d'éluion continu en chlorure de sodium de 0 à 1 M dans le tampon phosphate de sodium 0,004 M de pH 6,8 et obtient ainsi les composés 1, 2 et 3. Le composé 2, seul, possède une activité antitrypsique et son pic d'éluion est asymétrique. L'auteur en a conclu que l'ovomucoïde était hétérogène et que les préparations étudiées contenaient 2 protéides contaminants : le composé 1 qui est dépourvu de glucide et le composé 3 qui contient 0,9 p.100 d'acide sialique et possède un rapport hexosamine/hexose égal à 1,4. Plus tard BEELEY et JEVONS (134) postuleront que ce dernier composé pourrait suggérer la présence de l'ovoglycoprotéine de KETTERER dans laquelle le taux d'acide sialique est égal à 3 p.100 et le rapport hexosamine/hexose égal à 1.

2° - En 1962, CHATTERJEE et MONTGOMERY (135) chromatographient sur colonne de DEAE-cellulose équilibrée dans un tampon phosphate 0,005 M de pH 7, l'ovomucoïde préparé par la méthode de LINEWEAVER et MURRAY. En éluant par un gradient linéaire de sulfate de sodium 0 à 1 M dans un tampon phosphate 0,05 M de pH 7, ils séparent un composant mineur d'un composant majeur. Ce dernier, correspondant à l'ovomucoïde a seul retenu l'attention des auteurs ; soumis à l'ultracentrifugation, il se révèle homogène, mais l'électrophorèse libre montre quatre pics distincts.

3° - En 1964-1965, ADAM-CHOSSON (136) et MONTREUIL et coll. (137) appliquent différents procédés chromatographiques à la purification de l'ovomucoïde.

-- Chromatographie sur SE-cellulose : L'éluion était obtenue par un gradient continu de citrate de sodium, le pH croissant de 3 à 6.

-- Chromatographie sur divers Sephadex : G-25, G-50, G-75, G-100 et G-200. Le déplacement était effectué avec de l'eau.

-- Chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite : Le lavage et la désorption étaient réalisés avec un gradient discontinu de phosphate de sodium de pH 6,9.

Aucune de ces techniques n'a fourni aux auteurs une entité physico-chimique bien définie.

4° - En 1969, KANAMORI et KAWABATA (138) ont fractionné sur CM-cellulose des préparations d'ovomucoïde obtenues par un procédé au sulfate d'ammonium et purifiées par chromatographie sur DEAE-cellulose. Ils ont ainsi obtenu quatre fractions parmi lesquelles deux contiendraient les apoprotéines d'un "flavomucoïde" et les deux autres l'ovomucoïde. Les quatre composés possèdent la même constante de sédimentation ($S_{20}^{2,50}$), des masses moléculaires

identiques (28 000), des compositions en hexoses (8 à 9 p.100) et un "rapport molaire mannose : galactose (4:1)" semblables. Elles se distinguent les unes des autres par leurs teneurs en osamine et en acide sialique et surtout par des différences "remarquables" du point de vue de leur composition en acides aminés. Les résultats de ces auteurs sont précisés et discutés dans nos travaux personnels.

III - CONCLUSIONS

Vers 1959 commençaient au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille les premiers travaux de détermination de la composition et de la structure de l'ovomucoïde. Très vite, les chercheurs constatèrent que les résultats étaient fragmentaires, parfois contradictoires, souvent discordants, comme nous venons de l'exposer.

Dans le but de préciser les meilleures conditions de préparation de l'ovomucoïde, ADAM-CHOSSON (139) et MONTREUIL et coll. (140) ont appliqué systématiquement toutes les méthodes que nous avons décrites plus haut et ont soumis toutes les substances isolées à des études physiques, chimiques et immunologiques. Les conclusions que ces auteurs ont tirées de leur étude critique sont les suivantes :

- Aucun des nombreux procédés de préparation de l'ovomucoïde ne permet l'isolement d'une entité physico-chimique. Toutes les méthodes conduisent à des préparations qui sont hétérogènes à l'ultracentrifugation, à l'électrophorèse, à l'immuno-électrophorèse et à l'analyse chimique. Elles renferment au moins quatre constituants protéidiques différents.

- Les préparations obtenues par ébullition sont partiellement dénaturées. Les procédés par ébullition sont donc à rejeter au profit des méthodes utilisant l'acide trichloracétique ou le phénol.

Aucun des procédés de purification décrits ne permet d'obtenir un ovomucoïde homogène à l'analyse immuno-électrophorétique.

C'est pourquoi l'un des buts qui nous fut fixé, lorsque nous avons entrepris nos propres recherches, à la suite de ce travail, fut d'isoler l'ovomucoïde pur.

3 - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE L'OVOMUCOÏDE

Les études physico-chimiques de l'ovomucoïde ont été effectuées sur des préparations dont l'homogénéité était loin d'être parfaite. Les propriétés qui ont été décrites par les auteurs sont en réalité une moyenne de celles des différents composants dont les proportions varient d'un "ovomucoïde" à l'autre, suivant le procédé employé pour sa préparation.

Au moment où nous entreprenions nos recherches, MONTREUIL et coll. (141) venait de faire le point des connaissances sur l'ovomucoïde en publiant les résultats de leur étude critique des propriétés physico-chimiques des nombreuses préparations. Depuis, aucun ouvrage n'a apporté une meilleure définition de l'ovomucoïde ou, plus exactement, des "ovomucoïdes".

Il y a quelques années, nous empruntons à cette étude la plupart de nos hypothèses de travail ; aujourd'hui c'est à cette même source que nous avons puisé bon nombre des informations qui seront exposées dans ce chapitre.

I - PROPRIETES PHYSIQUES

A - SOLUBILITE

L'ovomucoïde est très soluble dans l'eau et ses solutions aqueuses sont très stables. Il n'est précipité ni par l'ébullition, ni par l'acide trichloracétique, ni par le phénol.

Il est précipité de ses solutions aqueuses par le sulfate d'ammonium à saturation, par quatre volumes d'acétone à pH 3,5, ou par l'éthanol avec une concentration finale en alcool de 42 p.100.

B - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE

L'ovomucoïde est hétérogène à l'analyse électrophorétique. Cette hétérogénéité se manifeste principalement lorsque l'on utilise des solutions tamponnées de pH bas et de faible concentration ionique.

1° - Electrophorèse libre

Dans un tampon de pH 6,9 et de force ionique 0,13, l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH (fraction II C) ; est homogène en donnant toutefois un pic légèrement étalé et asymétrique (FREDERICQ et DEUTSCH (142) ; BIER et al. (143,144) ; BRAGG et HOUGH (145)) ; au contraire, dans un tampon

véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,1 apparaissent deux pics (FREDERICQ et DEUTSCH (146)) (Figure 3 ; p.25) et en réduisant la force ionique à 0,01 cinq pics deviennent visibles à des pH variant de 4 à 8,6 (BIER et al. (147,148)).

Dans de telles conditions expérimentales, MONTREUIL et coll. (149) ont caractérisé dans l'ovomucoïde de LONGSWORTH et coll. (150) 4 constituants (Figure 3 ; p.25) dont les vitesses de migration électrophorétique (exprimées en $\text{cm}^{-2} \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1} 10^{-5}$) sont les suivantes :

Composant 1	:	6,2	($\pm 0,3$)
Composant 2	:	4,9	($\pm 0,3$)
Composant 3	:	3,8	($\pm 0,2$)
Composant 4	:	3,2	($\pm 0,2$)

Dans toutes les préparations d'ovomucoïde, le composant 3 est le plus important et représente 60 à 80 p.100 des protéides totaux.

2° - Electrophorèse de zone

L'électrophorèse de zone confirme les résultats de l'électrophorèse libre.

En effet, si l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH (fraction II C, "ovomucoïde purifié") est homogène en électrophorèse à pH 9 (BRAGG et HOUGH (151)), il se révèle hétérogène à pH 4,22 et quatre bandes peuvent être mises en évidence. L'électrophorèse sur acétate de cellulose dont le pouvoir séparateur est plus élevé, montre la présence de cinq constituants comme l'illustre la figure 4a (p.26) empruntée à MONTREUIL et coll. (152).

Des résultats comparables ont été obtenus par BELAMED (153) qui a étudié les propriétés électrophorétiques, en gel d'amidon, de l'ovomucoïde préparé par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY (154) et par le procédé chromatographique de RHODES, BENNETT et FEENEY (155). MONTREUIL et coll. (156) ont généralisé ces résultats à diverses préparations d'ovomucoïde. La figure 5a (p.27) montre que l'hétérogénéité est manifeste dans tous les cas.

L'électrophorèse en gélose (Figure 5b ; p.27) ne permet pas de définir avec précision la vitesse de migration électrophorétique de l'ovomucoïde qui est suivant les préparations, celle d'une globuline β_1 ou celle d'une globuline α_2 ou celle d'une globuline α_1 . En outre, quelques préparations donnent une tache supplémentaire plus rapide (MONTREUIL et coll. (157)).

Enfin, l'examen des électrophorèses en gélose et en gel d'amidon permet de vérifier l'intégrité chimique des préparations. On remarque, en effet, que les constituants des préparations d'ovomucoïde obtenues par ébullition sont sur les électrophorèses en gélose, colorés plus intensément par

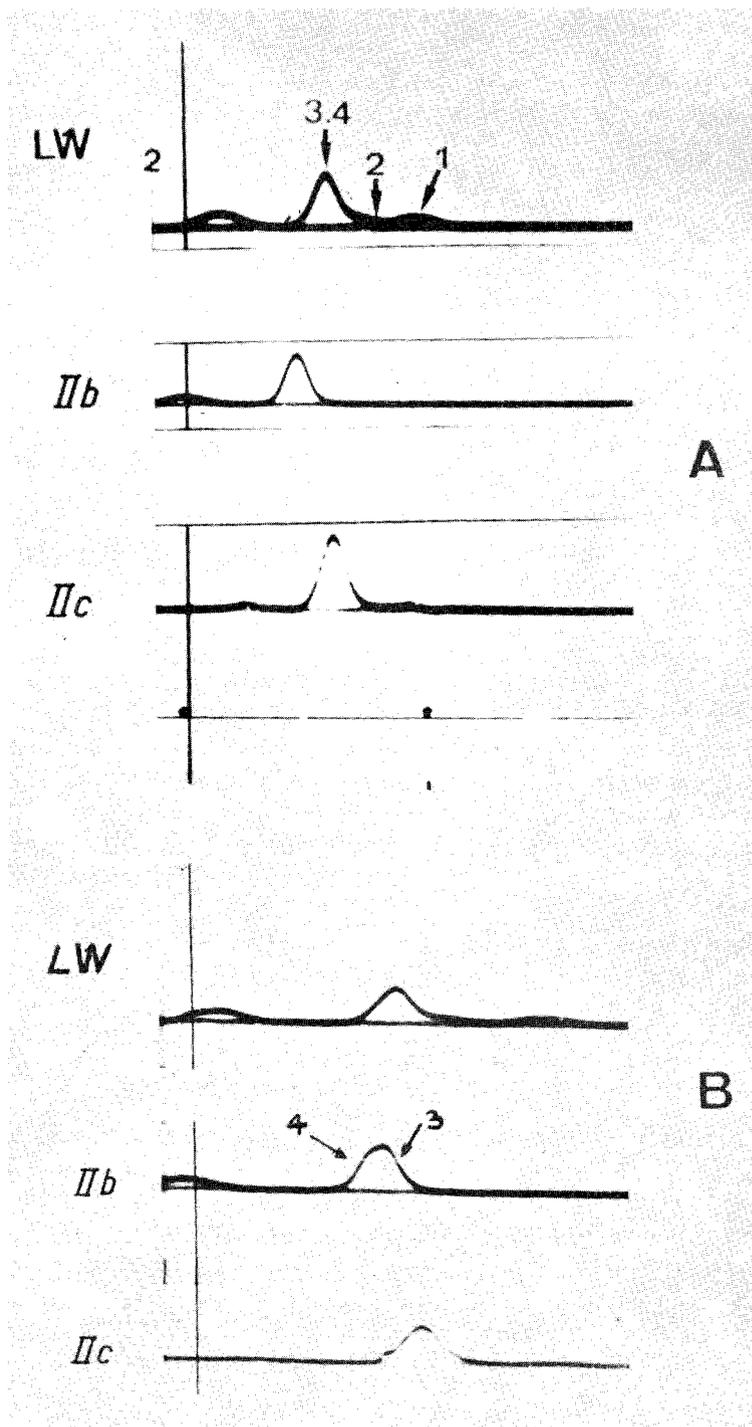
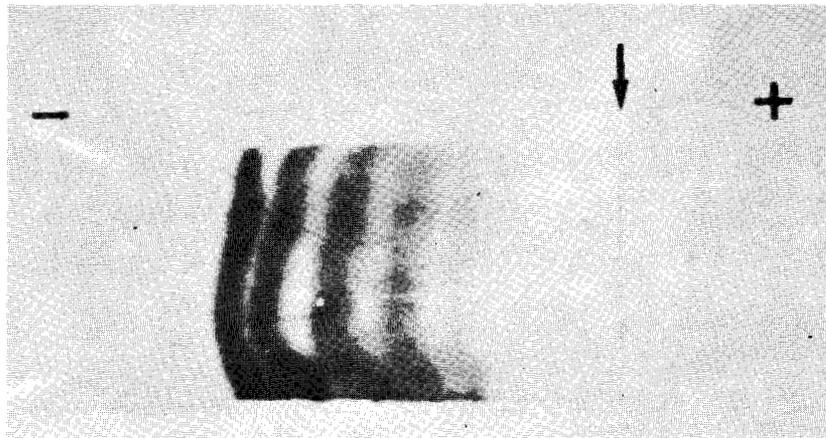


Figure 3

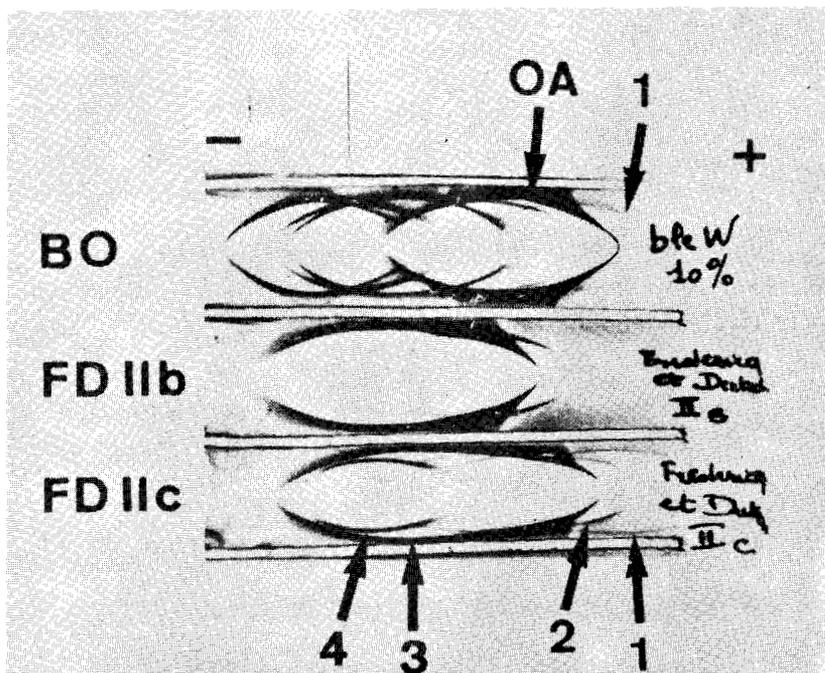
Diagrammes d'électrophorèse libre de préparations d'ovomucoïde. Tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,1. Frontière ascendente. Durée de l'électrophorèse : 3 600 sec. (A) et 7 200 sec. (B). LW : "ovomucoïde de LONGSWORTH et coll.". (158) FD IIb, FD IIc : Précipités IIb et IIc ("ovomucoïde purifié") obtenus par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (159).

Les chiffres 1, 2, 3 et 4 désignent les composants de vitesse de migration électrophorétique, respectivement 6,2 ; 4,9 ; 3,8 et 3,2.

(D'après MONTREUIL et coll. (160)).



-a-

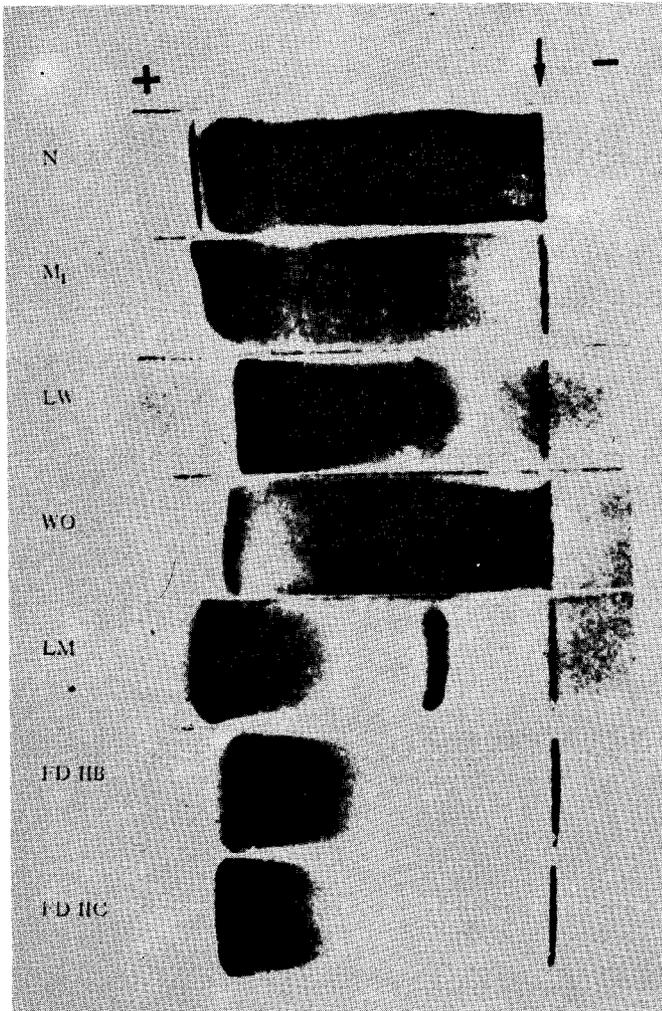


-b-

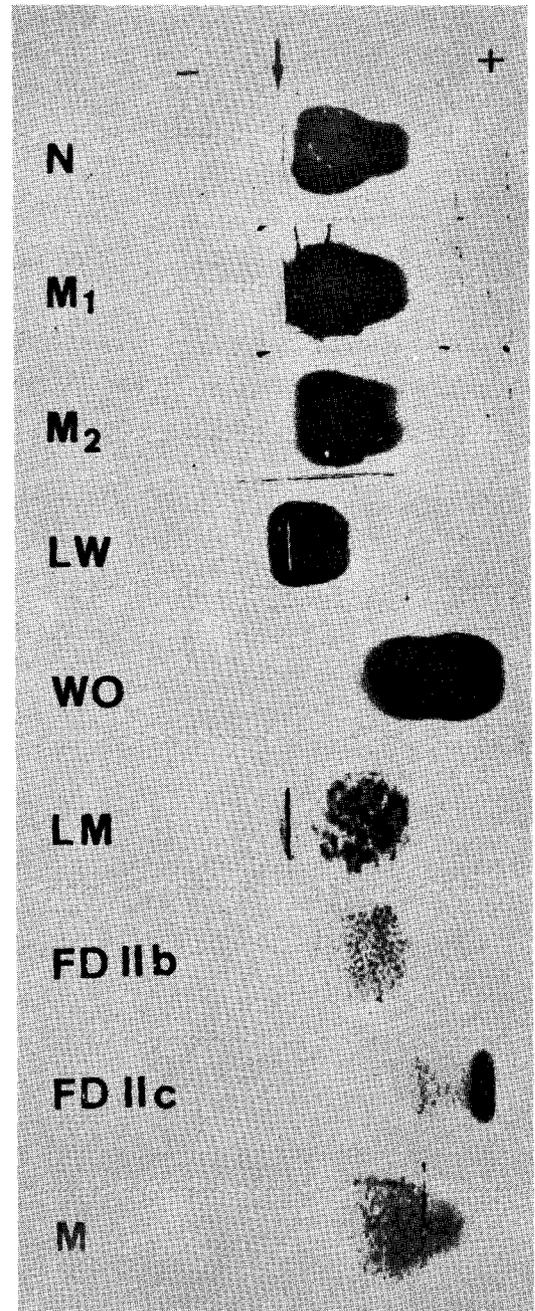
Figure 4

Electrophorèse sur acétate de cellulose (a) du précipité IIc et diagramme immuno-électrophorétique (b) des précipités IIb et IIc préparés par la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (D'après MONTREUIL et coll. (161).

OA : ovalbumine ; BO : blanc d'oeuf ; 1 : arc de la préalbumine ; 2 : arc de la globuline α_1 ; 3 : arc de la globuline β_1 ; 4 : arc de la globuline β_2 .



-a-



-b-

Figure 5

Electrophorèse en gel d'amidon (a) et en gélose (b) de préparations d'ovomucoïde obtenues par différents procédés. (D'après MONTREUIL et coll. (162)).

Les lettres désignent le mode de préparation de l'ovomucoïde ; N : NEUMEISTER (163) ; M₁ : premier procédé de MÖRNER (164) ; M₂ : second procédé de MÖRNER (165) ; LW : LONGSWORTH et coll. (166) ; FD IIb, FD IIc : précipité IIb et IIc ("ovomucoïde purifié") FREDERICQ et DEUTSCH (169) ; M : procédé de MICHON (170) adapté par MONTREUIL et coll. (171) à l'ovomucoïde.

l'Amidoschwarz que ceux des préparations obtenues par les procédés à l'acide trichloracétique et au phénol. En électrophorèse sur gel d'amidon, ils donnent des bandes très diffuses qui s'étalent jusqu'au trait de départ de l'électrophorégramme. MONTREUIL et coll. (172) en ont conclu que les préparations obtenues par la chaleur sont profondément dénaturées et les ont condamnées au bénéfice surtout des préparations à l'acide trichloracétique.

C - COMPORTEMENT IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE

Toutes les préparations d'ovomucoïde étudiées par MONTREUIL et coll. (173) se révèlent à l'analyse immuno-électrophorétique formées de 4 constituants antigéniquement distincts.

Le diagramme immuno-électrophorétique caractéristique d'une préparation d'ovomucoïde, illustré par la figure 4b (p.26) empruntée à ces auteurs, montre en effet, quatre arcs de précipitation. Les vitesses de migration électrophorétique sont celles d'une préalbumine (arc n°1), d'une globuline α_1 (arc n°2), d'une globuline β_1 (arc n°3) et d'une globuline β_2 (arc n°4). Seule la fraction II B obtenue par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH donne deux arcs de précipitation (arcs n°2 et n°3). Cette fraction représenterait donc la préparation d'ovomucoïde la moins hétérogène, alors que la fraction II C a été retenue par FREDERICQ et DEUTSCH qui l'ont considérée comme de "l'ovomucoïde purifié" et qui a fait l'objet de leurs recherches.

L'arc de la globuline β_1 a été identifié à l'ovomucoïde par JUTISZ et al. (174) qui ont, en outre, caractérisé l'arc du lysozyme dans une préparation obtenue par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY.

L'identité des arcs n°1, n°2 et n°4 est actuellement inconnue.

D - DIAGRAMME D'ULTRACENTRIFUGATION, CONSTANTE DE SEDIMENTATION, MASSE MOLECULAIRE

1° - Quel que soit le procédé de préparation de l'ovomucoïde, les diagrammes d'ultracentrifugation révèlent la présence d'un seul pic à des pH variant de 1,4 à 11,6 : ALDERTON et FEVOLD (175) ; BIER, DUKE, GIBBS et NORD (176) ; YOUNG (177). Cependant, l'homogénéité des préparations n'est qu'apparente. En effet, les pics sont toujours asymétriques comme le montre la figure 6 (p.29) empruntée à MONTREUIL et coll. (178).

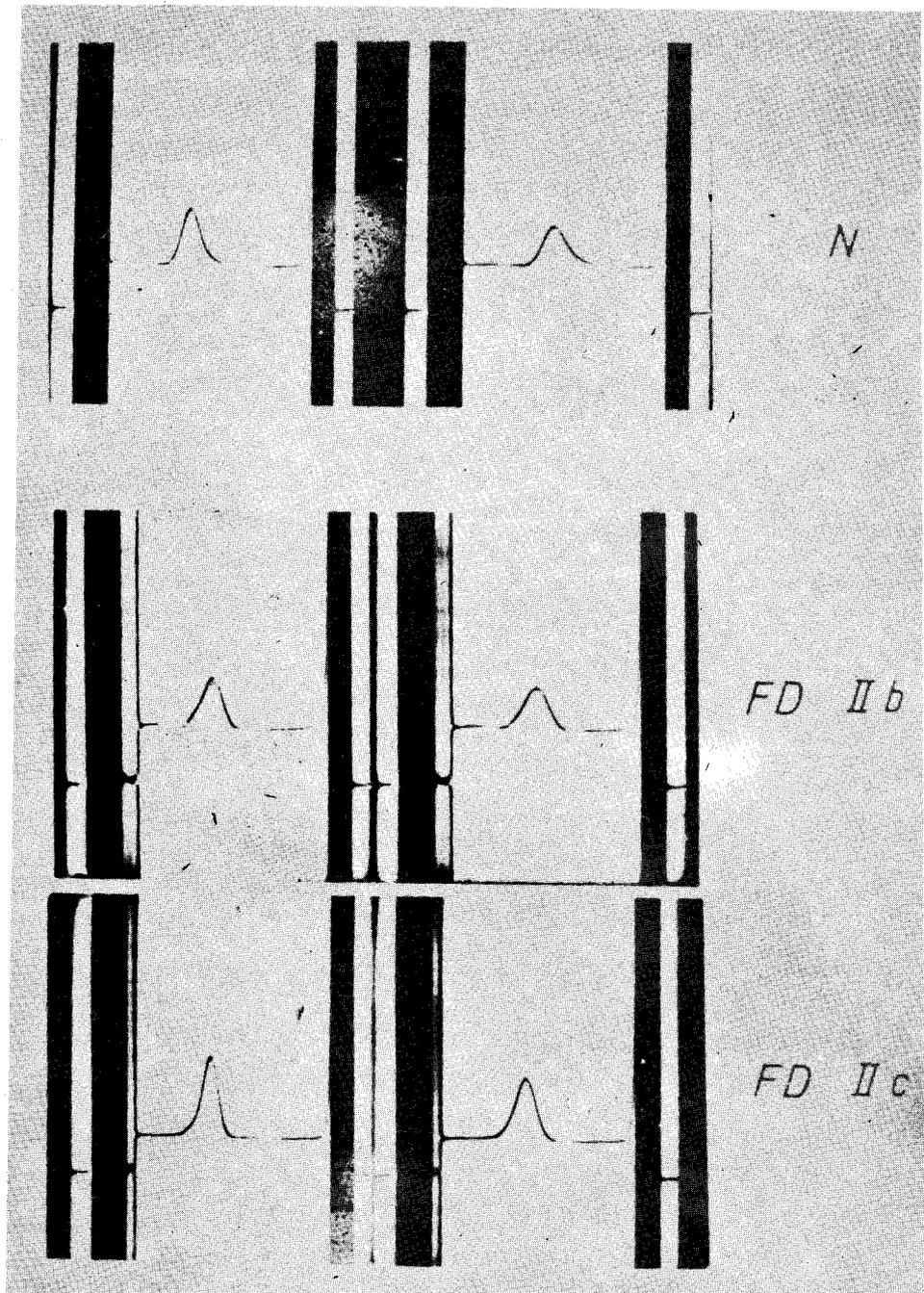


Figure 6

Diagramme d'ultracentrifugation de préparations d'ovomucoïde.

N : préparation selon NEUMEISTER (179) : asymétrie de la branche droite du pic.

FD IIb, FD IIc : précipités IIb et IIc ("ovomucoïde purifié") obtenus selon FREDERICQ et DEUTSCH (180) : asymétrie de la branche gauche du pic.

(D'après MONTREUIL et coll.) (181)

2° - Les constantes de sédimentation varient dans de larges proportions d'un ovomucoïde à l'autre. Les valeurs obtenues par MONTREUIL et coll. (182) pour diverses préparations sont rassemblées dans le Tableau III (p.31). Elles se situent entre celle de 2,8 obtenue par FREDERICQ et DEUTSCH (183) et celle de 2 obtenue par HARBON et al. (184). Elles se rapprochent de celle de 2,49 obtenue par RHODES et al. (185). Les valeurs les plus élevées sont fournies par les ovomucoïdes préparés par les procédés les plus dénaturants, comme l'ébullition en présence de sels minéraux.

3° - Selon FREDERICQ et DEUTSCH (186), la masse moléculaire de l'ovomucoïde est égale à 27 000 pour une constante de sédimentation S_{20w} de $2,8 \times 10^{-13}$, une constante de diffusion D_{20} de 8×10^{-7} et un volume spécifique partiel de 0,685.

Ce résultat concorde avec la valeur de 28 800 déterminée par la mesure de la pression osmotique (LINEWEAVER et MURRAY (187)) et celle de 28 500 déduite de la composition en acides aminés (LEWIS et al. (188)). Il s'éloigne cependant de la valeur de 31 500 que DEUTSCH et MORTON (189) ont calculé plus récemment pour l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH (190) en se basant sur une constante de sédimentation S_{20w} de $2,62 \times 10^{-13}$, une constante de diffusion D_{20} de $6,01 \times 10^{-7}$ et un volume spécifique partiel de 0,685. Il s'éloigne aussi de la valeur de 24 000 que MONTREUIL et coll. (191) à la suite de leur étude critique, ont été amenés à proposer comme masse moléculaire moyenne des préparations d'ovomucoïde.

E - POINT ISOELECTRIQUE

Le point isoélectrique de l'ovomucoïde varie de 3,9 (FREDERICQ et DEUTSCH (192)) à 4,3 (LONGSWORTH, CANNAN et Mc INNES (193)) et 4,5 (HESELVIK (194)). Une fois de plus la discordance de ces résultats peut s'expliquer par la présence dans les préparations étudiées par les auteurs, de constituants différents en quantités variables. En effet, BIER et al. (195) ont caractérisé dans les ovomucoïdes de FREDERICQ et DEUTSCH et de LINEWEAVER et MURRAY, l'existence de cinq composants dont les points isoélectriques sont 4,41 ; 4,28 ; 4,17 ; 4,01 et 3,83.

En outre, FREDERICQ et DEUTSCH (196) ont montré que la dénaturation de l'ovomucoïde par la chaleur se manifeste par une modification du point isoélectrique.

Tableau III

Constantes de sédimentation à 20°C de différentes préparations d'ovomucoïde.

Selon MONTREUIL et coll. (197)

Procédés de préparation	Agent de dénaturation	$S_{20} \times 10^{-13}$
NEUMEISTER (198)	chaleur	2,4
MÖRNER I (199)	chaleur	2,3
MÖRNER II (200)	chaleur	1,15
WERNER et ODIN (201)	chaleur	2,3 à 2,4
LONGSWORTH <u>et al.</u> (202)	chaleur	2,6
LINEWEAVER et MURRAY (203)	ATCA (*)	2,35
FREDERICQ et DEUTSCH (204)	ATCA (*)	
Précipité II c "Ovomucoïde purifié"		2,35
Précipité II b		2,27
MEYER (205)	Acétone	2,35
MONTREUIL et coll. (206)	Phénol	2,4

(*) : Acide trichloracétique.

F - PROPRIETES PHYSIQUES DIVERSES

Aucune étude précise n'a été effectuée pour déterminer la forme de la molécule d'ovomucoïde. Cependant le coefficient de friction est égal à 1,35. Cette valeur correspond à une molécule globulaire équivalente à un sphéroïde aplati (JIRGENSONS *et al.* (207)) dont le rapport axial est égal à 6,3 (FREDERICQ *et* DEUTSCH (208)).

Nous avons rassemblé dans le Tableau IV (p.33) quelques unes des propriétés physiques de l'ovomucoïde que nous n'avons pas décrites dans les paragraphes précédents.

II - PROPRIETES CHIMIQUES

Depuis que l'on a reconnu définitivement à l'ovomucoïde une nature glycoprotéinique, sa composition chimique a fait l'objet de très nombreuses études.

Avant de préciser l'état actuel de nos connaissances sur le glycanne et la protéine, nous nous proposons d'en exposer rapidement l'historique.

A- CHIMIE DU GROUPEMENT GLYCANNIQUE

Bien que l'ovomucoïde ait été isolé dès 1890 et sa nature glycoprotéinique reconnue dès 1898, sa composition en glucides ne fut définie que cinquante ans plus tard.

La glucosamine, grâce à ces propriétés particulières, fut identifiée dès 1896 par WEYDEMAN (209) dans les produits d'hydrolyse alcaline de l'ovomucoïde, puis par ZANETTI (210), accompagnée, précisait l'auteur, d'acide sulfurique dans les hydrolysats chlorhydriques. Ces résultats furent confirmés par LANGSTEIN (211), en 1903, qui infirmait en outre, la présence d'acide sulfurique et par OSWALD (212), en 1910. Plus tard, la présence de la glucosamine fut définitivement établie grâce à l'application des méthodes modernes d'analyse. MASAMUNE (213) en 1950 et ROSEMAN *et* DAFNER (214) en 1956 avaient signalé la présence de galactosamine (glucosamine/galactosamine = 2). Depuis, aucune étude n'a confirmé ces résultats.

Tableau IV

Valeur des constantes physiques diverses de l'ovomucoïde de l'oeuf de poule.

	Valcur	Références
Constante de diffusion : D_{20} ($10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$)	8	FREDERICQ et DEUTSCH, 1949 (215)
	7,7	RHODES et al., 1960 (216)
Volume spécifique partiel.....	0,71	RHODES et al., 1960 (217)
Pouvoir rotatoire spécifique.....	-56°	LINWEAVER et MURRAY, 1947 (218)
	-78°	CHATTERJEE et MONTGOMERY, 1962 (219)
$\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$ 280 nm.....	6,1	RHODES et al., 1958 (220)
	4,1	CHATTERJEE et MONTGOMERY, 1962 (221)
Rapport axial.....	6,3	FREDERICQ et DEUTSCH, 1949 (222)

La détermination de la nature des oses neutres fut plus longue et plus délicate. Certes, très tôt, la phénylglucosazone avait été identifiée dans les produits de l'action de la phénylhydrazine sur les hydrolysats acides d'ovomucoïde, mais ce résultat ne permettait pas de conclure à la présence de glucose, puisque glucose, mannose, fructose, glucosamine et mannosamine fournissent la même osazone. L'existence du mannose fut démontrée pour la première fois, en 1927 par FRAENKEL et JELLINEK (223) qui l'identifièrent par sa phénylhydrazone à côté de la glucosamine caractérisée sous la forme de chlorhydrate. En 1929, LEVENE et MORI (224) confirmèrent ce résultat.

Le galactose fut trouvé dans les hydrolysats d'ovomucoïde par SØRENSEN (225) en 1934, puis par STACEY et WOLLEY (226), en 1940-1942.

Cependant, en 1945, MEYER (227) infirmait la présence de galactose et attribuait à la fraction glucidique de l'ovomucoïde la composition suivante : mannose et N-acétyl glucosamine (1:1).

Mais, l'application de méthodes de coloration spécifiques et des techniques modernes d'analyse chromatographique a définitivement établi que les oses constituant l'ovomucoïde étaient le galactose, le mannose et la N-acétylglucosamine (BRAGG et HOUGH (228)); LEE et MONTGOMERY (229)). A ces composés est venu récemment s'ajouter l'acide N-acétylneuraminique (LEE et MONTGOMERY (230)).

En 1961 l'aspect qualitatif du problème de la composition en oses de l'ovomucoïde était définitivement élucidé. Il n'en était pas de même de l'aspect quantitatif. Nous avons rassemblé dans le Tableau V (p.35) classés par ordre chronologique les résultats de différents auteurs concernant les compositions en glucides de l'ovomucoïde. On voit que ces résultats sont très discordants et il faudra attendre 1964-1965 pour que ADAM-CHOSSON (231) et MONTREUIL et coll. (232) montrent que l'extrême variabilité de cette composition était corrélative du procédé utilisé pour obtenir l'ovomucoïde. Nous avons réuni les résultats de ces auteurs dans les Tableaux VI (p.36) et VII (p.37). Deux groupes de préparations peuvent être distingués. Dans un premier groupe les teneurs en oses et en acide sialique sont élevées et le rapport mannose/galactose voisin de 4 ; dans le second, les teneurs en oses et en acide sialique sont plus faibles et le rapport mannose/galactose égal à 5. Au premier groupe se rattachent les ovomucoïdes obtenus par des procédés brutaux de dénaturation (ébullition en présence ou en absence de sels minéraux, suivie d'une précipitation par l'éthanol à + 20°C : méthodes de NEUMEISTER, de MÖRNER et de LONGSWORTH et al.).

Tableau V

Composition en glucides de l'ovomucoïde selon différents auteurs.

	Dates	Glucides p. 100	Oses p. 100	Osamines p. 100	Acide sialique p. 100	$\frac{\text{Oses}}{\text{Osamines}}$	Composition *
LEVENE et MORI (233)	1929	-	-	-	-	0,5	Man, GlcNAc (1:2)
SØRENSEN (234)	1934	-	9,2	-	-	-	Gal, Man (1:3)
HEWITT (235)	1938	-	10,5	9,5	-	1,1	Gal, Man
STACEY et WOOLLEY (236)	1940-42	-	-	-	-	0,57	Gal, Man, GlcNAc (1:3:7)
MEYER (237)	1945	22 à 26	10	12 à 16	-	-	Man, GlcNAc (1:1)
LINEWEAVER et MURRAY (238)	1947	21,6	-	-	-	-	
FREDERICQ et DEUTSCH (239)	1949	26,7	9,7	17	-	0,57	
DIXON (240)	1955	19,2	10	9,2	-	1,09	Gal, Man, GlcNAc (2:7:9)
GOTTSCHALK et ADA (241)	1956	21,8	5,7	14,1	2	0,4	Gal, Man, GlcNAc (1:3:10)
ODIN (242)	1958	23,6 à 25	8,6-9	14-15	1	0,60	Gal, Man, GlcNAc (1:3,3:7)
RHODES <u>et al.</u> (243)	1960	-	-	-	0,5	-	
FEENEY <u>et al.</u> (244)	1960	-	-	-	0,7	-	
BRAGG et HOUGH (245)	1961	21	8	12,3	0,65	0,65	Gal, Man, GlcNAc (1:3,7:7,2)
HARTLEY et JEVONS (246)	1962	-	-	-	-	-	Gal, Man, GlcNAc (1:3,5:7)
CHATTERJEE <u>et al.</u> (247)	1962	20,7	5,7	14,6	0,40	-	Gal, Man, GlcNAc (1:4,7:14)
HARBON <u>et al.</u> (248)	1963	22,7	8,8	13	0,9	0,68	Gal, Man, GlcNAc (1:3:6)
MONTREUIL <u>et al.</u> (249)	1963	23,8	8,8	14,2	0,8	0,62	Gal, Man, GlcNAc (1:5:9)

* : Gal : galactose, Man : mannose, GlcNAc : N-acétylglucosamine.

Tableau VI

Composition centésimale en glucides de préparations d'ovomucoïde obtenues
par différentes méthodes. (en g p.100 g de protéide).
(Selon MONTREUIL et coll. (250)).

Méthodes	Agent de dénaturation	Oses	GlcNAc (*)	ANAN (**)	Glucides totaux	Oses / GlcNAc(*)	Oses / ANAN (**)
NEUMEISTER (251)	chaleur	9,1	13,5	1,13	21,35	0,674	8,05
MÖRNER I (252)	chaleur	9,3	15,18	1,16	23,08	0,61	8,02
MÖRNER II (253)	chaleur	2,9	4,80	0,32	7,22	0,60	9,06
WERNER et ODIN (254)	chaleur	9,05	14,17	1,41	22,17	0,64	6,42
LONGWORTH et al. (255)	chaleur	10,7	13,69	2,96	24,62	0,78	3,61
LINEWEAVER et MURRAY (256)	ATCA(***)	9,05	14,62	1,43	22,6	0,62	6,33
FREDERICQ et DEUTSCH (257)							
Ovomucoïde "brut"		8,81	13,27	1,27	21,02	0,66	6,94
Fraction II b		8,1	12,94	1,23	20,05	0,63	6,53
Fraction II c (ovomucoïde "pur")		9,2	15,41	1,85	21,44	0,60	4,97
MEYER (258)	acétone	9,7	13,05	1,26	21,61	0,74	7,70
FORSYTHE et FOSTER (259)	éthanol	10,1	13,23	1,54	22,39	0,70	6,55
MONTREUIL et coll. (260)	phénol	7,9	11,36	1,29	18,50	0,70	6,12

(*) : N-acétylglucosamine. (**) : acide N-acétylneuraminique. (***) : acide trichloracétique.

Tableau VII

Composition en oses neutres, en N-acétylglucosamine et en acide N-acétylneuraminique de préparations d'ovomucoïde obtenues par différentes méthodes. (En moles par rapport au galactose).

(Selon MONTREUIL et coll. (261))

Méthodes	Agent de dénaturation	Gal. (*)	Man. (**)	GlcNAc (***)	ANAN (****)
NEUMEISTER (262)	chaleur	1	4,2	8,9	0,6
MÖRNER I (263)	chaleur	1	4,3	9	0,57
MÖRNER II (264)	chaleur	1	4,3	8	0,84
WERNER et ODIN (265)	chaleur	1	5,2	10	0,40
LONGWORTH <u>et al.</u> (266)	chaleur	1	3,5	7,1	0,6
LINEWEAVER et MURRAY (267)	ATCA (*****)	1	5,1	10,6	0,48
FREDERICQ et DEUTSCH (268)					
Ovomucoïde "brut"	ATCA (*****)	1	5,2	10	0,40
Fraction III b		1	5,1	10,5	0,30
Fraction II c (ovomucoïde "pur")		1	4,8	9,2	0,40
MONTREUIL et coll. (269)	phénol	1	5	10	0,49

- * : Galactose
- ** : Mannose
- *** : N-acétylglucosamine
- **** : acide N-acétylneuraminique
- ***** : acide trichloracétique

Au second groupe appartiennent les "ovomucoïdes" isolés par des procédés de dénaturation relativement doux (fractionnement éthanolique à - 15°C du filtrat de défécation trichloracétique du blanc d'oeuf : méthodes de FREDERICQ et DEUTSCH et de LINEWEAVER et MURRAY).

Cependant, les valeurs du rapport mannose/galactose, qu'il soit voisin de 4 ou égal à 5, sont dans tous les cas supérieures aux valeurs déterminées par la plupart des auteurs qui trouvent généralement un rapport égal à 3 ou voisin de 3 : SØRENSEN : 3 (270), STACEY et WOOLEY : 3 (271), GOTTSCHALK et ADA : 3 (272), ODIN : 3,3 (273), BRAGG et HOUGH : 3,7 (274), HARBON et al. : 3 (275,276). Elles se rapprochent pourtant de celles de CHATTERJEE et MONTGOMERY (277) qui ont trouvé un rapport égal à 4,7 (278).

MONTREUIL et coll. (279) ont expliqué ce désaccord dans les résultats par la nature même de l'hydrolyse appliquée à l'ovomucoïde. En effet, la plupart des auteurs avaient utilisé les résines échangeuses de cations ou l'acide sulfurique pour libérer les oses constituant les glycoprotéines. Or ce procédé ne conduit jamais à une hydrolyse totale. Tandis que la libération du galactose est quantitative, il n'en est pas de même pour le mannose qui fait partie de la fraction stable de la molécule (BRAGG et HOUGH (280) ; MONTREUIL et coll. (281,282,283)).

Dans ces conditions, le rapport mannose / galactose est plus faible que dans le cas d'une hydrolyse complète par l'acide chlorhydrique (MONTREUIL et SCHEPPLER (284) ; MICHON et BOURRILLON (285) ; GOT et al. (286)). Il semble donc bien que la valeur du rapport mannose/galactose dans l'ovomucoïde doive être fixée à 4 ou 5 selon le procédé de préparation.

B - CHIMIE DE LA FRACTION PROTEIQUE

La composition en acides aminés de l'ovomucoïde préparé par la méthode de LINEWEAVER et MURRAY (287) a été déterminée par LEWIS et al. (288), STEVENS et FEENEY (289) et par MARSHALL et NEUBERGER (290). DEUTSCH et MORTON (291) ont analysé l'ovomucoïde obtenu par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (292) tandis que OSUGA et FEENEY (293) ont étudié l'ovomucoïde préparé par le procédé chromatographique de RHODES, AZARI et FEENEY (293). Enfin KANAMORI et KAWABATA (294) ont analysé des préparations obtenues par leur propre procédé. Nous avons rassemblé les résultats de ces différents auteurs dans le Tableau VIII (p.39). On voit en particulier, que l'ovomucoïde ne semble pas contenir de tryptophane. En effet, parmi les déterminations les plus récentes, seules celles de KANAMORI et KAWABATA (295)

Tableau VIII

Composition en acides aminés de l'ovomucoïde selon différents auteurs.

Nature des acides aminés	LEWIS et al. 1950(296)	STEVENS et FEENEY 1963 (297)	MARSHALL et NEUBERGER 1960 (298)	DEUTSCH et MORTON 1961 (299)	OSUGA et FEENEY 1967 (300)	KAFAMORI et KAWABATA 1969 (301)
	Résidus / 100000 g	Résidus / 100000 g	Résidus/mole de M.M. 28000	Résidus/mole de M.M. 31500	Résidus/mole de M.M. 28000	Résidus/mole de M.M. 28000
Acide aspartique	98	95,2	27	37	31,9	16
Acide glutamique	44	47,1	13	16	14,9	20
Arginine	21	19,2	5	8	6,3	5
Histidine	13,8	15,6	4	5	4,3	6
Lysine	41	41	12	16	13,6	17
Alanine	26	35,6	10	14	11,7	13
Cystine / 2	55	58,4	16	21	17,5	-
Glycocolle	51	49,4	14	18	16,1	10
Isoleucine	11	10,7	3	4	3,2	7
Leucine	39	36,6	10	13	12,2	13
Méthionine	6,4	7	2	2	1,9	3
Phénylalanine	17,6	15,1	4	6	5,3	6
Proline	23,6	20,3	6	8	7,7	8
Sérine	40	35,5	10	15	12,5	16
Thréonine	46	45,3	13	17	14,6	10
Tryptophane	1,5	1,5	0	-	0	3
Tyrosine	17,6	19	5	8	6,7	5
Valine	51	50	14	18	16	9

révèlent la présence de 3 résidus de cet acide aminé par mole de masse moléculaire 28 000. On remarquera en outre que pour la plupart des acides aminés, les résultats de KANAMORI et KAWABATA (302) sont en net désaccord avec les résultats des autres auteurs.

L'ovomucoïde ne contient pas de groupe sulfhydryl libre (LINEWEAVER et MURRAY (303)).

La teneur en azote amidé est de 0,45 p.100 soit 9,3 molécules par molécule d'ovomucoïde (MARSHALL et NEUBERGER (304)).

L'acide aminé N-terminal est l'alanine (0,64 à 0,94 molécule par molécule d'ovomucoïde de poids moléculaire 28 800): FRAENKEL-CONRAT et PORTER (305) ; NOBLE et al. (306) ; OSUGA et FEENEY (307).

L'acide aminé C-terminal est la phénylalanine (0,8 molécule par molécule d'ovomucoïde : PENASSE et al. (308) ; TURNER et SCHMERZLER (309).

Ces résultats, associés au fait que la rupture de tous les ponts disulfures ne modifie pas la masse moléculaire (DEUTSCH et MORTON) (310), sont en faveur de l'existence d'une seule chaîne peptidique dans la molécule d'ovomucoïde.

4 - LA STRUCTURE

L'étude de la structure d'une glycoprotéine pose trois problèmes : le premier concerne la protéine, le second, le groupement glycanique et le troisième, les modalités du point d'attache glycanne-protide. Dans le cas de l'ovomucoïde, seules les deux dernières questions ont fait l'objet de recherches approfondies dont nous nous proposons d'exposer brièvement les résultats.

I - LE GROUPEMENT GLYCANNIQUE

Après avoir infirmé l'hypothèse d'une association ionique acide mucoïtine sulfurique-protéine dans l'ovomucoïde, LEVENE et SUAREZ (311) et LEVENE et MORI (312) proposèrent en 1929 le schéma structural résultant de l'association de la protéine avec des unités polyosidiques constituées par le triholoside : glucosamine dimannoside. MEYER (313) corrigea cette conception en proposant le schéma d'un diholoside du mannose et de la glucosamine.

A la suite d'expériences de méthylation, STACEY et WOOLEY (314) attribuèrent au groupement polyosidique une structure ramifiée (Fig. 7 ; p.41).

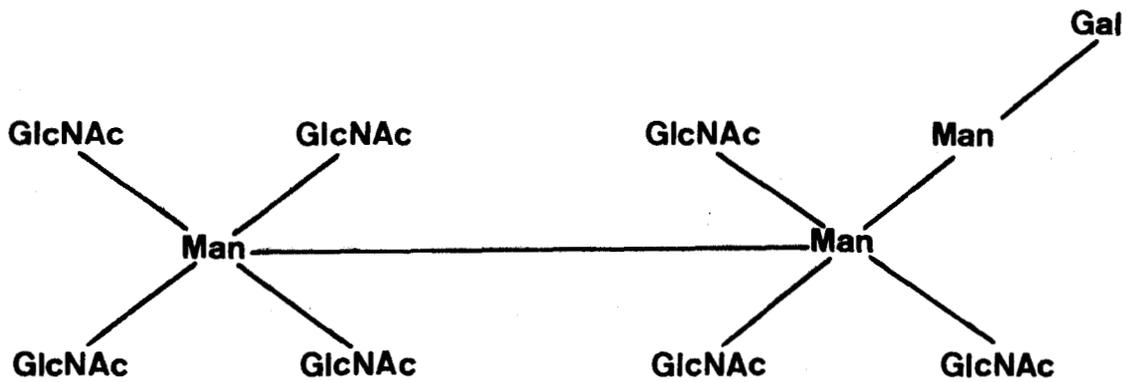


Figure 7

Schéma de structure du groupement glycanique de l'ovomucoïde proposé par STACEY et WOOLLEY (1940 - 1942).

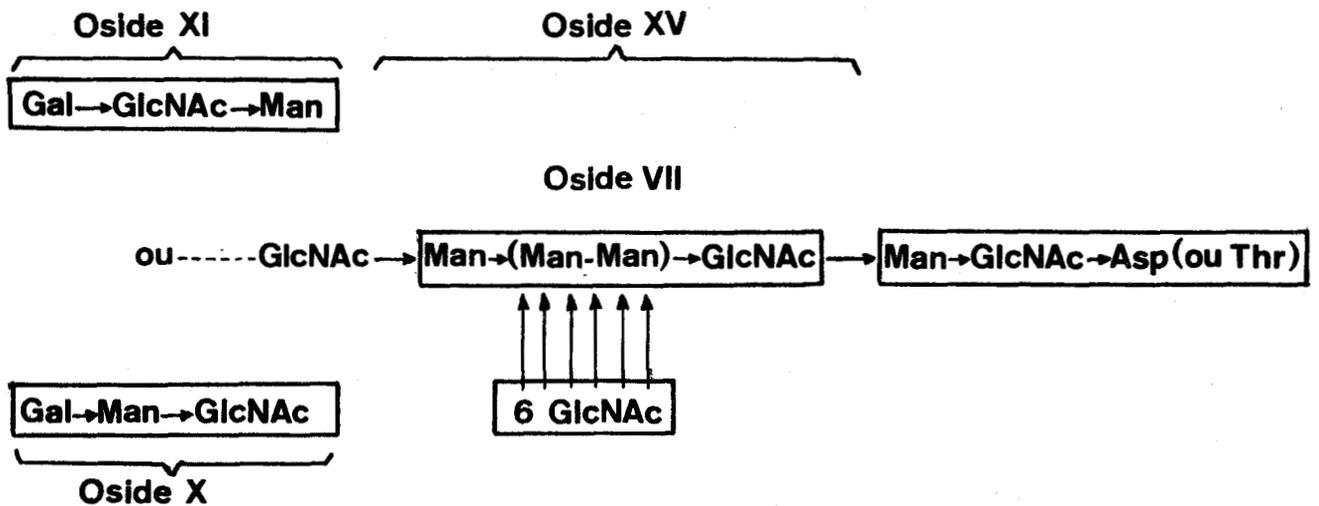


Figure 8

Schéma général de structure du groupement glycanique de l'ovomucoïde proposé par ADAM - CHOSSON et MONTREUIL (315).

Asp : Asparagine
 Thr : Thréonine
 Gal : Galactose
 Man : Mannose
 GlcNAc : N-acétylglucosamine

En 1961, BRAGG et HOUGH (316) ont repris les expériences de méthylation des autours précédents en appliquant en outre la méthode d'hydrolyse ménagée et le procédé d'oxydation par l'acide periodique à l'isolement et à l'étude de la structure d'osides. Ils n'ont pu démontrer le schéma de STACEY et WOOLEY mais ils ont, cependant, confirmé la réalité de certains motifs structuraux en identifiant, par exemple le 2,3,4,6 tétra-méthyl-galactose, un mannobiose et une mannosylglucosamine.

Récemment, MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (317) ont mis au point des procédés d'hydrolyse acide partielle de l'ovomucoïde dont l'application a conduit ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (318) à l'isolement de 15 oligosides dont l'étude de la structure et de la vitesse d'apparition dans les hydrolysats leur a permis d'infirmier le schéma de STACEY et WOOLEY et de proposer un nouveau schéma encore fragmentaire que nous avons reproduit à la figure 8 (p.41).

Enfin, en associant aux résultats précédents ceux que lui avait fournis l'application du procédé de perméthylation des osides, DUPONT (319) est parvenu à un schéma (Fig. 9 ; p. 43) qui ne doit plus être très éloigné de la structure réelle des glycanes de l'ovomucoïde.

II - LE POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE

La grande stabilité des glycoprotéines en général, suggère que la liaison polyoside-protéine est de nature covalentielle.

En 1961, TANAKA (320) avait isolé à partir des hydrolysats barytiques de l'ovomucoïde par fractionnement éthanolique et par chromatographie sur des colonnes de charbon-célite, quatre fractions glycoprotidiques riches en acide aspartique. L'étude de la structure de ces fractions avait conduit l'auteur à la conclusion qu'il existe dans l'ovomucoïde des liaisons de l'acide aspartique avec la glucosamine.

En 1962-1963 cette conclusion était infirmée par HARTLEY et JEVONS (321) et par BEELEY et JEVONS^(321bis) dont les travaux étaient en faveur de l'hypothèse de liaisons O-thréonyl et O-séryl osidiques sans toutefois en apporter la démonstration.

Au contraire, CHATTERJEE et MONTGOMERY (322) et MONTGOMERY et WU (323) précisaient que la liaison glycanne-protéine se faisait par l'intermédiaire de la fonction amide de l'asparagine. Les recherches de ces auteurs ainsi que celles de MARKS, MARSHALL, NEUBERGER et PAPKOFF (324) et de NEUBERGER et PAPKOFF^(324bis) suggéraient en outre la pluralité du groupement glycanne.

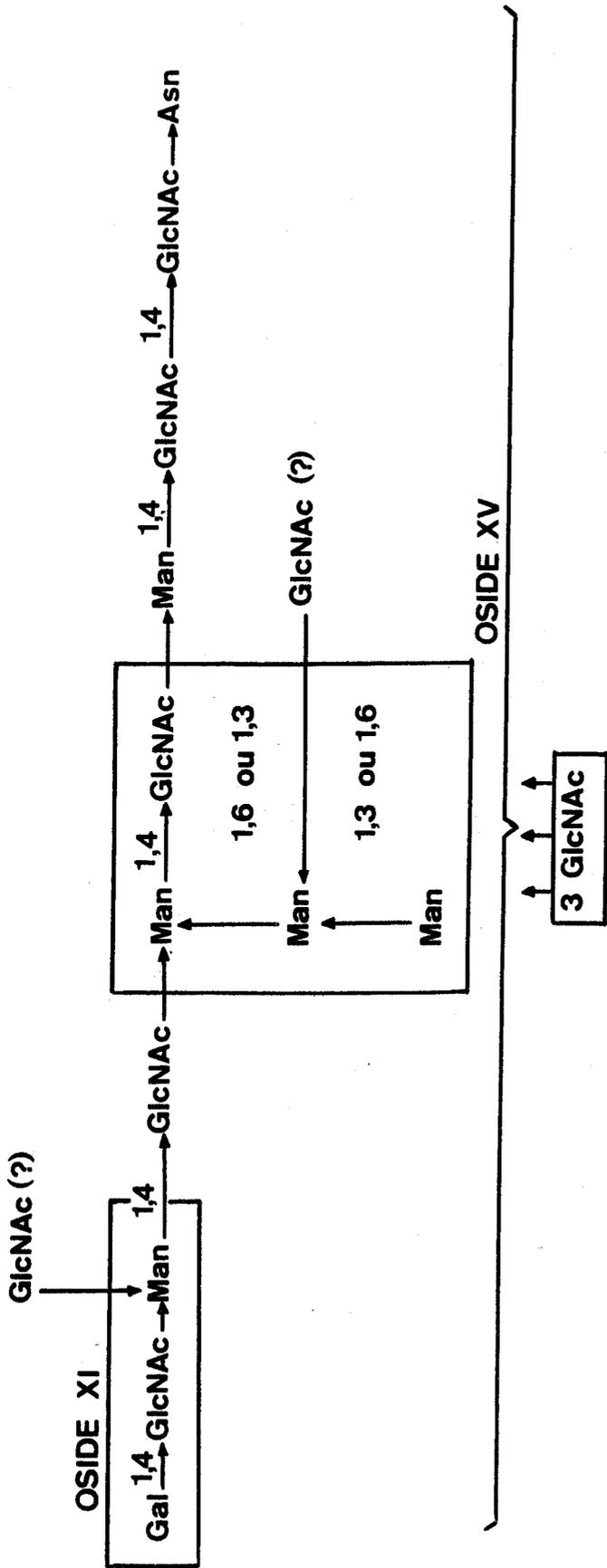


Figure 9
Schéma fragmentaire de structure du glycopeptide β de l'ovomucoïde (DUPONT) (325).

Parallèlement, ADAM-CHOSSON (326) et MONTREUIL et coll. (327,328) décrivaient l'isolement, par chromatographie sur Sephadex et SE-cellulose et par électrophorèse préparative, à partir d'hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH, de trois glycopeptides α_4 , β et γ dont la composition est précisée dans le Tableau IX (p.45). On voit que les trois glycopeptides contiennent de l'acide aspartique, mais que les glycopeptides β et γ renferment en plus, le premier de la thréonine, le second de la cystine.

L'étude du glycopeptide β a conduit ADAM-CHOSSON (329) à la conclusion qu'il existerait dans l'ovomucoïde, quatre chaînes glycaniques dont deux seraient unies à la protéine par des liaisons O-thréonyl-N-acétyl-glycosaminidiques et deux autres par des liaisons N-(β -aspartyl)-N-acétyl-glucosaminylaminiques (Fig. 10 ; p.46).

Plus récemment, MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (330) ont démontré qu'il n'existait pas de liaison O-thréonyl-glycosidique dans l'ovomucoïde, et que les glycannes au nombre de deux étaient unies à la chaîne peptidique uniquement par des liaisons de type N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylaminique.

Pour expliquer la présence des glycopeptides α_4 , β et γ et en se fondant sur leur composition en oses, ADAM-CHOSSON (331) et MONTREUIL, CASTIGLIONI, ADAM-CHOSSON, CANER et QUEVAL (332) ont émis l'hypothèse que les préparations d'ovomucoïde contiennent trois glycopeptides. L'ovomucoïde "proprement dit" et l'allo-ovomucoïde qui fourniraient respectivement les glycopeptides β et γ dépourvus d'acide sialique et l'ovoglycoprotéine de KETTERER auquel correspondrait le sialoglycopeptide α_4 .

C'est dans le but de vérifier cette hypothèse que nous a été confiée la mission d'isoler des glycoprotéines dont les glycopeptides α_4 , β et γ étaient les témoins de la présence.

5 - LES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

L'ovomucoïde inhibe les activités protéolytique et estérasique de la trypsine en formant avec l'enzyme un complexe équimolaire (LINEWEAVER et MURRAY (333) ; RHODES et al. (334).

En 1947, LINEWEAVER et MURRAY (335) avaient aussi reconnu, à l'ovomucoïde, une action sur la chymotrypsine que WU et LASKOWSKI (336) ont infirmée en 1955 et que WEIL et TIMASHEFF (337), au contraire, ont confirmée en 1960. En 1962, FEENEY, STEVENS et OSUGA (338) ont montré que l'inhibition de la chymotrypsine par l'ovomucoïde était

Tableau IX

Composition molaire en glucides et en acides aminés des glycopeptides α_4 , β et γ isolés des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH (ADAM-CHOSSON) (339) ; (MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON) (340).

	α_4	β	γ
Galactose	1	1	1
Mannose	3	5	5
N-acétylglucosamine	4	9	9
Acide N-acétylneuraminique	1	0	0
Acide aspartique	1	1	1
Thréonine	0	1	0
Cystine	0	0	1

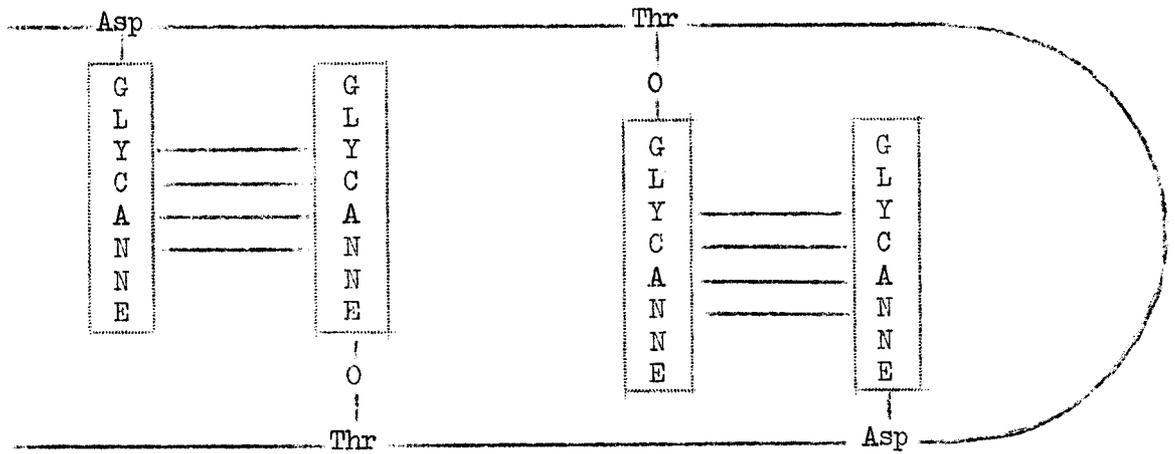


Figure 10

Schéma hypothétique proposé par ADAM - CHOSSON (341) pour la structure générale de l'ovomucoïde.

————— Liaisons hydrogène.

due à la contamination de l'ovomucoïde par l'ovoinhibiteur de MATSUSHIMA (342).

L'activité antitrypsique de l'ovomucoïde n'est pas affectée par l'acide trichloracétique et les sels neutres, mais elle décroît sous l'action de la température, particulièrement en milieu alcalin comme le démontre la figure 11 (p.48). Cette observation suggère une dénaturation partielle de l'ovomucoïde préparé par les procédés à l'ébullition.

Le mécanisme de l'activité antitrypsique de l'ovomucoïde est encore mal connu. FRAENKEL-CONRAT et al. (343,344) et SRI-RAM (345) ont montré que l'estérification des fonctions carboxyliques de l'ovomucoïde ou l'acétylation des fonctions aminées de la trypsine empêchent la formation du complexe. La dissociation du complexe à des valeurs de pH inférieures à 3 (GREEN (346) ; SRI-RAM et al. (347)), suggère que l'ionisation des fonctions carboxyliques de l'enzyme ou de l'ovomucoïde ou des deux à la fois, joue un rôle important dans les modalités de l'interaction des deux partenaires. D'autre part, le blocage des fonctions aminées de la trypsine n'inhibe pas son activité protéolytique, on peut donc conclure que cette dernière met en jeu des fonctions différentes de celles qui interviennent dans la formation du complexe.

L'étude cinétique de l'activité antitrypsique de l'ovomucoïde montre que l'inhibition est d'abord directement proportionnelle à la quantité d'ovomucoïde en réaction, mais qu'à l'approche du point d'équivalence, elle devient asymptotique ; finalement, en présence d'un grand excès d'ovomucoïde, l'activité enzymatique n'est pas totalement abolie (GORINI et AUDRAIN (348)).

Ce phénomène a été interprété de diverses manières, mais il serait d'une grande importance pour le développement de l'embryon si le rôle naturel de l'ovomucoïde résidait dans son activité antitrypsique.

Le caractère compétitif de l'inhibition trypsique de l'ovomucoïde est controversé. En effet, la constante de dissociation du complexe (5×10^{-9} M) est beaucoup plus petite que la constante de MICHAELIS de la trypsine lorsqu'elle agit sur les substrats protéiques utilisés dans les méthodes classiques d'étude de l'activité enzymatique. Dans ce cas il est donc impossible de mettre en évidence une inhibition compétitive. Cependant en utilisant un substrat synthétique comme le benzoylarginine éthyloester, pour lequel la trypsine a une constante de MICHAELIS de l'ordre de 10^{-5} M, GREEN (349) a montré que l'ovomucoïde peut déplacer le substrat et inversement.

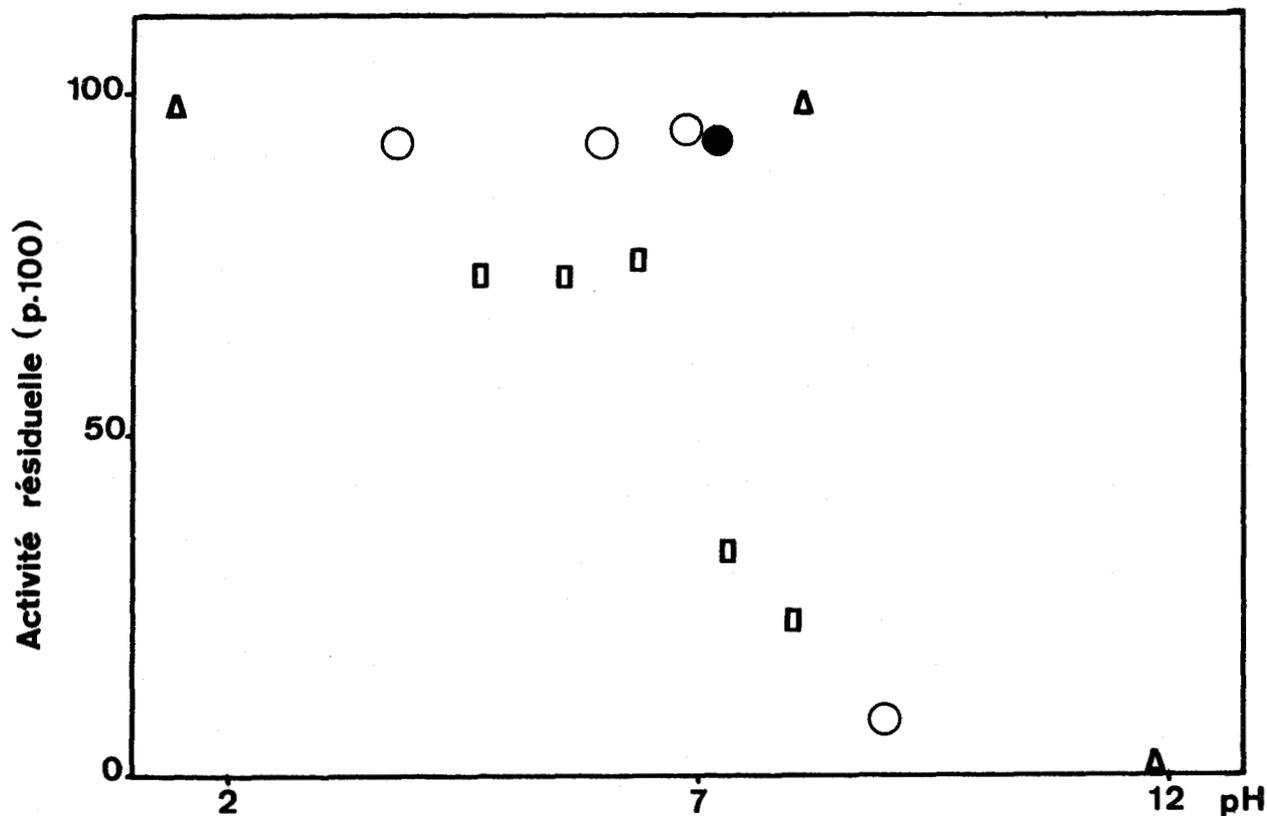


Figure 11

Action du pH et de la température sur l'activité antitrypsique de l'ovomucoïde. Des solutions d'ovomucoïde ont été soumises à diverses conditions de pH et de température. L'activité inhibitrice résiduelle a été mesurée à pH 8.

Δ : Température du laboratoire (JIRGENSON et al.(350)).

○ : Après chauffage à 80°C pendant 30 minutes (LINEWEAVER et MURRAY (351)).

● : Après chauffage à 80°C pendant 30 minutes dans une solution d'urée 9 M. (STEVENS et FEENEY (352)).

□ : Après chauffage à 100°C pendant 15 minutes (DEUTSCH et MORTON (353)).

Enfin, il faut signaler que l'injection de blanc d'oeuf provoque chez le rat un syndrome du type anaphylactique (LEGER et al. (354)). LEGER et MASSON (355) et ANKIER et WEST (356) ont montré que l'injection d'ovomucoïde provoquait la réaction de l'animal, tandis que les protéines résiduelles du blanc d'oeuf étaient inactives.

6 - CONCLUSIONS

Des travaux portant depuis près d'un siècle sur l'ovomucoïde ont abouti ces dernières années à une somme de résultats considérable. Il faut cependant constater que des contrôles systématiques sévères des préparations d'ovomucoïde ont très rarement été effectués. Les études ont donc porté sur des substrats parfois partiellement ou profondément dénaturés, toujours contaminés plus ou moins considérablement par d'autres protéides du blanc d'oeuf. Elles ne pouvaient pas conduire à des conclusions concordantes qui permettent une définition précise des propriétés physico-chimiques de l'ovomucoïde.

La seconde conclusion que nous pouvons tirer de notre étude bibliographique et qui était déjà impliquée dans la première, est que l'un des caractères le plus constamment reconnu à l'ovomucoïde est son hétérogénéité électrophorétique. La nature de cette hétérogénéité a été diversement interprétée sur la base de résultats expérimentaux divergents.

Selon une première conception, déduite des travaux de BIER et al. (357,358), l'ovomucoïde serait constitué de cinq protéides très voisins différant les uns des autres par des détails de composition ou de structure. Il s'agirait d'un cas de polymorphisme analogue à ceux qui ont été signalés à propos de la transferrine, de l'orosomucoïde et de la fétuine.

Au contraire, les résultats des études immuno-électrophorétiques sont en faveur de la présence dans l'ovomucoïde, de plusieurs entités antigéniques différentes et selon JUTISZ et al. (359) l'ovomucoïde pur serait électrophorétiquement homogène.

Enfin, associant les résultats de l'immuno-électrophorèse à ceux d'études de structure, MONTREUIL et coll. (360) attribuent à cette hétérogénéité une double cause. Une "macro-hétérogénéité" est due à l'existence de plusieurs protéides dans les préparations d'ovomucoïde qui lui-même présenterait une "micro-hétérogénéité" due à la présence de deux allotypes : l'ovomucoïde et l'allo-ovomucoïde. Au moment où nous commençons nos recherches, aucune preuve formelle n'était venue étayer ces diverses

conceptions. L'hétérogénéité électrophorétique de l'ovomucoïde demeurerait une énigme et les informations que nous possédions étaient de nature hypothétique.

Deviner cette énigme apparaissait pourtant fondamental pour que la reconstitution du "puzzle" dont l'hydrolyse partielle fournit les pièces, pût, dans l'avenir, être envisagée avec plus de sûreté et d'efficacité.

Pour cela, il fallait tout d'abord identifier les entités protéiques responsables des arcs présents sur les diagrammes immuno-électrophorétiques. Il fallait ensuite isoler l'ovomucoïde pur, confirmer son hétérogénéité, le fractionner en ses divers composants et déterminer les propriétés physico-chimiques de ces derniers.

C'est à cette tâche que nous nous sommes employé.

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

Nous avons entrepris nos recherches essentiellement pour tenter de résoudre le problème posé par l'hétérogénéité électrophorétique de l'ovomucoïde et dans le but final de vérifier les conclusions de MONTEUILL et coll. (361) concernant l'origine des glycopeptides fournis par l'hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde.

Il nous fallait donc identifier les différentes entités antigéniques révélées par l'analyse immuno-électrophorétique. Pour atteindre ce premier objectif nous avons émis l'hypothèse que les protéides responsables des arcs de précipitation observés sur les immuno-électrophorèses étaient, outre l'ovomucoïde et le lysozyme caractérisés par JUTISZ et al. (362), trois autres constituants du blanc d'oeuf : La riboflavoprotéine, l'ovoinhibiteur de MATSUSHIMA (363) et l'ovoglycoprotéine de KETTERER (364). Cette hypothèse découlait de notre étude bibliographique. En effet, la riboflavoprotéine possède une vitesse électrophorétique de préalbumine et MONTEUILL et coll. (364) ont montré la présence, dans l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH, d'un constituant ayant un tel comportement ; l'ovoglycoprotéine a été isolée de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER par KETTERER (365) tandis que l'ovoinhibiteur a été caractérisé dans l'ovomucoïde de LINEWEAVER et MURRAY par FEENEY, STEVENS et OSUGA (366). L'application des méthodes originales décrites par les auteurs pour la préparation de ces composés ne nous a pas fourni des substances immuno-électrophorétiquement homogènes. Nous avons donc été amené à mettre au point des procédés nouveaux de préparation ou de purification de ces trois protéides.

La plupart des propriétés de la riboflavoprotéine étaient inconnues, celles de l'ovoglycoprotéine et de l'ovoinhibiteur avaient été étudiées sur des préparations impures et n'avaient jamais été confirmées. C'est pourquoi nous avons soumis les substances pures que nous avons obtenues à des études physiques, chimiques et immunologiques.

Après avoir précisé la composition en protéides des "préparations d'ovomucoïde" obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY, de FREDERICQ et DEUTSCH et de FORSYTHE et FOSTER, nous avons démontré l'hétérogénéité électrophorétique de "l'ovomucoïde" immuno-électrophorétiquement homogène que nous avons isolé. Nous avons alors mis au point plusieurs protocoles expérimentaux qui nous fournissent des quantités importantes des

composants de "l'ovomucoïde proprement dit".

Enfin, nous avons entrepris l'étude des propriétés physiques, chimiques, immuno-électrophorétiques et antitrypsiques de ces glycoprotéides.

Nous avons divisé l'exposé de nos travaux et de nos résultats en deux parties :

PREMIERE PARTIE : Hétérogénéité électrophorétique et immuno-électrophorétique des "préparations d'ovomucoïde". Isolement et propriétés des constituants.

- L'ovoinhibiteur de MATSUSHIMA
- L'ovoglycoprotéine de KETTERER
- La riboflavoprotéine
- L'ovomucoïde proprement dit
- Application à la solution du problème de l'hétérogénéité des préparations d'ovomucoïde.

DEUXIEME PARTIE : Hétérogénéité de "l'ovomucoïde"

- Mise en évidence de l'hétérogénéité
- Fractionnement de l'ovomucoïde
- Etude comparée des propriétés immuno-électrophorétiques, antitrypsiques, physiques et chimiques des ovomucoïdes.

PREMIERE PARTIE.

Hétérogénéité électrophorétique et immuno-électrophorétique des préparations d'ovomucoïde. Isolation et propriétés des constituants.

- L'ovoinhibiteur de MATSUSHIMA
- L'ovoglycoprotéine de KETTERER
- La riboflavoprotéine
- L'ovomucoïde proprement dit
- Application à la solution du problème de l'hétérogénéité des préparations d'ovomucoïde.

L'OVONHIBITEUR DE MATSUSHIMA

1 - PREPARATION

Trois méthodes ont été proposées pour la préparation de l'ovoinhibiteur :

- La méthode originale de MATSUSHIMA (367) qui consiste en un fractionnement du blanc d'oeuf par le sulfate d'ammonium, suivi d'une purification de l'ovoinhibiteur par l'acide trichloracétique et l'acétone.

- Le procédé chromatographique de FEENEY, STEVENS et OSUGA (368) qui emploie le fractionnement de l'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY sur CM-cellulose.

- La technique de TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVICH (369) qui applique à l'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY fourni par le commerce, la méthode au sulfate d'ammonium de MATSUSHIMA. Ces auteurs ont, en outre, démontré que les préparations obtenues par les procédés de MATSUSHIMA et de FEENEY et coll. étaient contaminées, la première par du lysozyme, la seconde par un constituant ayant un comportement électrophorétique "analogue à celui de l'ovalbumine".

C'est pourquoi nous avons employé la troisième méthode en l'appliquant à des préparations d'ovomucoïde selon LINEWEAVER et MURRAY obtenues dans notre laboratoire.

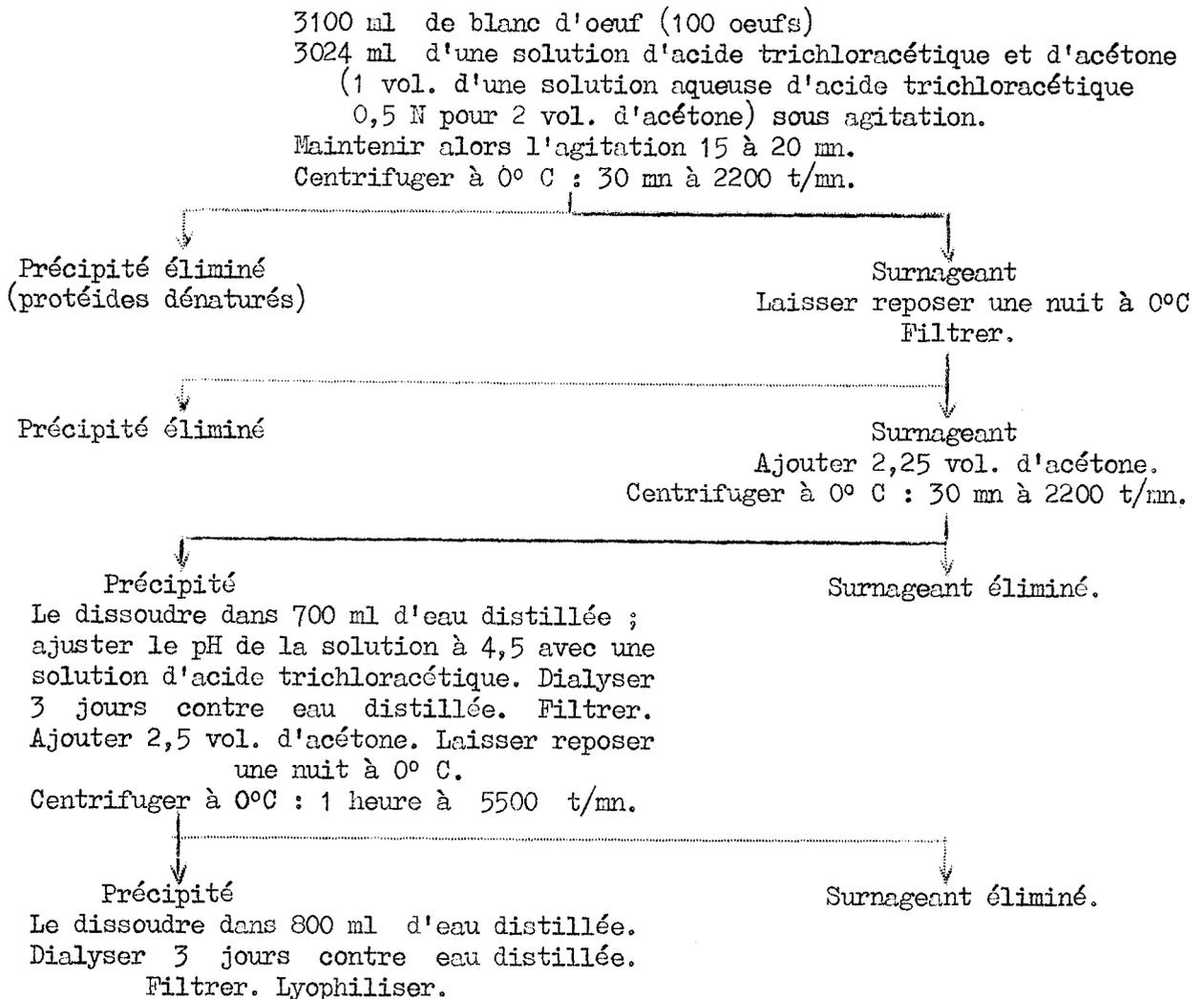
I - APPLICATION DE LA METHODE DE TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVICH.

A - MODE OPERATOIRE.

1°- PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA METHODE DE LINEWEAVER ET MURRAY (370)

3 100 ml de blanc d'oeuf (100 oeufs) sont déféqués par une solution acétono-trichloracétique et le filtrat est précipité par l'acétone suivant le schéma de la figure 12 (page 56).

Une telle préparation fournit 12 à 14 g d'ovomucoïde de LINEWEAVER et MURRAY.



Rendement : 12 à 14 g .

Figure 12

Schéma de préparation de l'ovomucoïde selon le procédé de
 LINEWEAVER et MURRAY (371).

2°- FRACTIONNEMENT DE L' "OVOMUCOÏDE" DE LINEWEAVER ET MURRAY SELON LE PROCÉDE DE TOMIMATSU, CLARY ET BARTULOVICH (372).

Une solution aqueuse à 5 p.100 d'ovomucoïde de LINEWEAVER et MURRAY est ajustée à pH 6 avec une solution de soude 1N et soumise à un fractionnement par le sulfate d'ammonium suivant le schéma de la figure 13 (page 58).

B - RESULTATS.

L'application du procédé de TOMIMATSU et al. nous a fourni en moyenne 1,450 g d'ovoinhibiteur par 60 g d'ovomucoïde traité.

L'analyse électrophorétique ne nous a pas donné des résultats identiques à ceux des auteurs précédents qui ont observé sur des électrophorèses en gel d'amidon, colorées par l'Amidoschwarz, l'image d'un seul constituant. Au contraire, les électrophorèses sur acétate de cellulose, colorées par la nigrosine nous révèlent comme l'illustre la figure 14 a (p.59) la présence d'un constituant majeur, (67 p.100 des protéides totaux) correspondant par son emplacement à l'ovoinhibiteur, souillé de deux autres constituants, l'un plus anodique (10 p.100 des protéides totaux) dans la zone de l'ovomucoïde, l'autre (23 p.100 des protéides totaux) possédant un comportement cathodique analogue à celui du lysozyme. La discordance de ces résultats peut s'expliquer par la nature même des supports utilisés pour effectuer les électrophorèses et par la différence des procédés de coloration employés.

En effet, en gel d'amidon, l'ovomucoïde donne des taches diffuses qui se colorent très mal par l'Amidoschwarz et se dissolvent ensuite dans les solutions de décoloration (MONTREUIL et coll. (373) ; OSUGA et FEENEY (374)). Dans ces conditions on peut admettre que les constituants qui souillent les préparations de TOMIMATSU et al. ont échappé à l'observation de ces auteurs qui avaient en outre soumis à l'analyse des solutions de protéides à 2,5 p.100 tandis que nous nous sommes servi de solutions à 5 p.100.

L'analyse immuno-électrophorétique que les auteurs précédents n'ont pas appliquée, confirme nos résultats. La figure 14 b (p.59) représente le diagramme immuno-électrophorétique obtenu après 24 heures de réaction avec l'immunsérum anti-protéides du blanc d'oeuf. A titre de comparaison, le blanc d'oeuf complet a été placé dans le trou supérieur

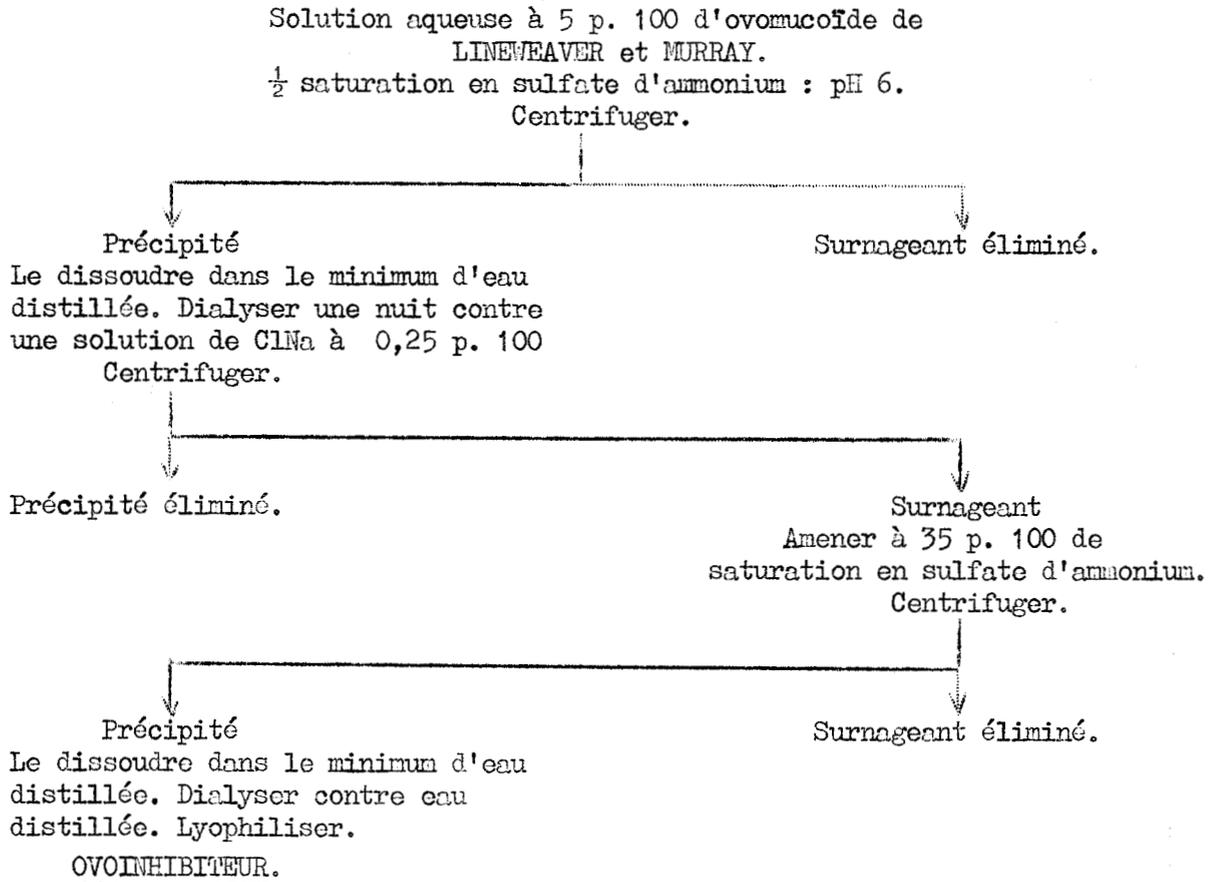


Figure 13

Schéma de préparation de l'ovoinhibiteur selon le procédé de
TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVICH (375).

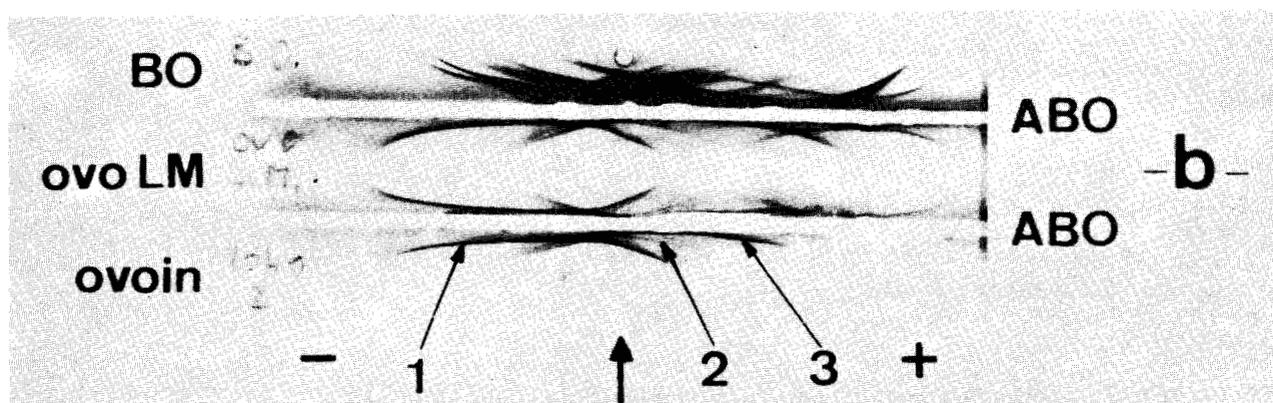
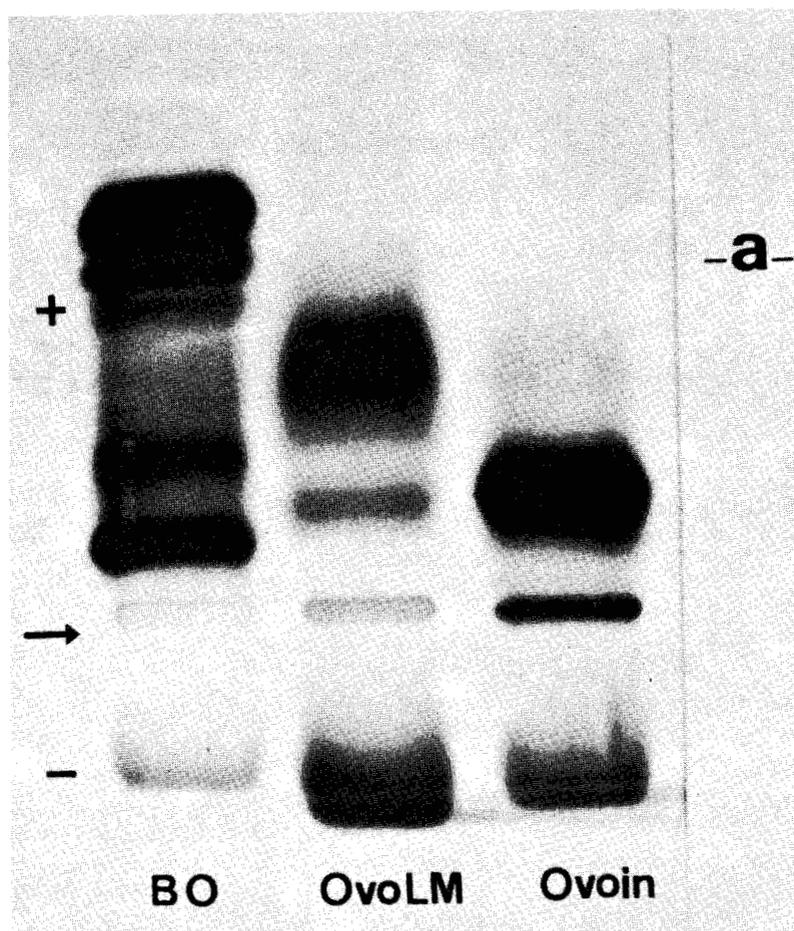


Figure 14

Electrophorèse sur acétate de cellulose (tampon véronal pH 8,65 ; μ : 0,07) (a) et immuno-électrophorèse (b) du blanc d'oeuf de Poule (BO), d'une préparation d'ovomucoïde selon LINEWEAVER et MURRAY (ovo LM) et d'une préparation d'ovoinhibiteur obtenue par le procédé de TOMIMATSU et al. (ovoin).

Les électrophorégrammes ont été révélés par une coloration double à l'Amidoschwarz et à la nigrosine.

ABO : sérum anti-protéides du blanc d'oeuf.

et l'ovomucoïde de LINEWEAVER et MURRAY dans le trou central. La préparation d'ovoinhibiteur placé dans le trou inférieur montre trois lignes de précipitation dont les comportements sont ceux d'un constituant cathodique γ (arc n° 1) d'une globuline β_3 (arc n° 2) et de l'ovomucoïde (arc n° 3).

C - CONCLUSIONS

La méthode de TOMIMATSU et al. est un procédé simple qui conduit à des préparations très enrichies en ovoinhibiteur. Elle ne fournit cependant pas un constituant immuno-électrophorétiquement homogène.

Afin d'éliminer les impuretés, nous avons appliqué à ces préparations, la chromatographie sur des colonnes de DEAE-cellulose et de CM-cellulose.

II - PROCEDE PERSONNEL DE PURIFICATION DE L'OVOINHIBITEUR OBTENU PAR LA METHODE DE TOMIMATSU, CLARY ET BARTULOVICH

A - PRINCIPE.

Notre protocole expérimental comprend deux étapes : au cours de la première, nous effectuons une chromatographie de l'ovoinhibiteur sur DEAE-cellulose ; dans la seconde nous soumettons le pic A issu de la chromatographie précédente à un fractionnement sur CM-cellulose selon un procédé voisin de celui décrit par FEENEY, STEVENS et OSUGA (376).

B - MODE OPERATOIRE.

1°- PREMIERE ETAPE : CHROMATOGRAPHIE DE L'OVOINHIBITEUR sur DEAE-CELLULOSE

Les protéides totaux d'une préparation d'ovoinhibiteur (voir p.57) (1,450 g en solution dans 20 ml de tampon phosphate 0,005 M de pH 4,7) sont soumis à la chromatographie sur des colonnes (2 x 40) de DEAE-cellulose stabilisée avec un tampon phosphate 0,005 M de pH 4,7. Le déplacement des constituants est effectué par le passage successif du tampon de stabilisation et d'un tampon phosphate 0,005 M + NaCl 0,07 M de pH 4,7.

La vitesse de passage des tampons est réglée à 33 ml/heure/cm² et des fractions de 10 ml sont recueillies toutes les 6 minutes.

Les solutions effluentes sont dialysées, puis lyophilisées. Les protéides sont soumis aux analyses électrophorétiques et immuno-électrophorétiques.

2°- DEUXIEME ETAPE : CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE.

0,5 g des protéides provenant du pic A de la chromatographie précédente (A - DEAE) sont dissous dans 5 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 4,6 et sont chromatographiés sur des colonnes (2 x 25 cm) de CM-cellulose stabilisée avec le tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 4,6. L'élution des protéides est obtenue d'abord par l'application d'un gradient linéaire de chlorure de sodium de 0 à 1 M dans le tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 4,6, puis par le passage du tampon limite utilisé pour le gradient.

Les fractions correspondant aux pics d'élution sont rassemblées, dialysées, lyophilisées et soumises à des analyses biologiques, électrophorétiques et immuno-électrophorétiques.

C -RESULTATS.

1°- CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE.

Le résultat d'un fractionnement est illustré par la figure 15 a (p.62). Trois fractions ont été obtenues. Les protéides de la fraction A (A - DEAE) ne sont pas retenus par la cellulose échangeuse d'anions et sont élués avec le front du tampon phosphate 0,005 M de pH 4,7. Les pics B₁ et B₂ émergent de la colonne dans le tampon phosphate 0,005 M + NaCl 0,07 M de pH 4,7. Les rendements de cette chromatographie sont les suivants (pour 1,450 g d'ovoinhibiteur).

- Pic A	:	1,145 g
- Pic B ₁	:	0,024 g
- Pic B ₂	:	0,095 g

L'analyse électrophorétique (Figure 16 a ; p.63) montre que la fraction A contient un constituant majeur : l'ovoinhibiteur souillé par environ 20 p.100 d'un constituant de comportement très cathodique. Les pics B₁ et B₂ renferment essentiellement l'ovomucoïde et des traces d'ovoinhibiteur.

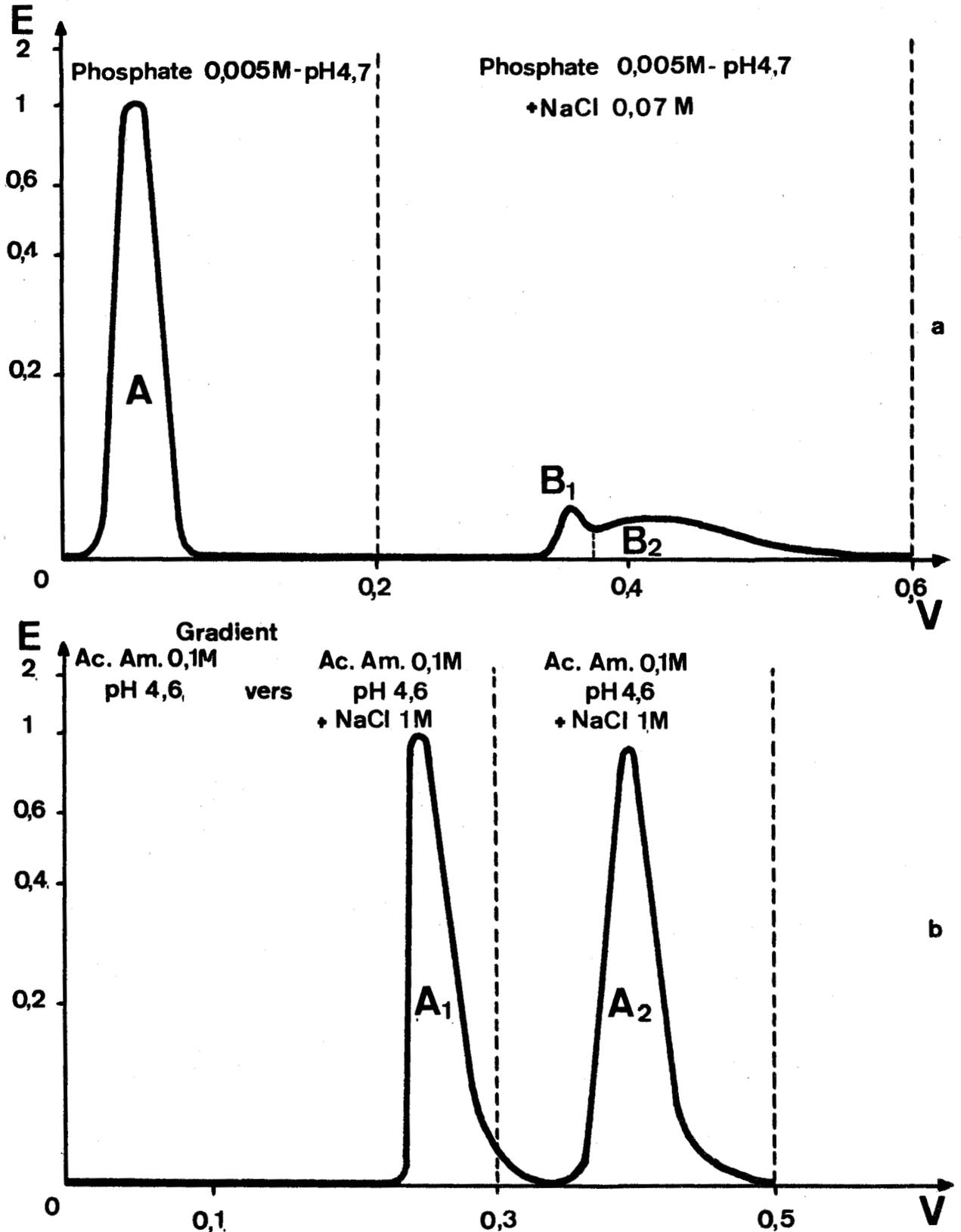


Figure 15

a : Chromatographie sur DEAE-cellulose d'une préparation d'ovoinhibiteur obtenue par le procédé de TOMIMATSU et al. (377)

b : Chromatographie sur CM-cellulose du pic A du diagramme - a - .

En abscisses : volumes des effluents exprimés en litres.
 En ordonnées : densité optique à 280 nm.
 Ac. Am. : Acétate d'ammonium.

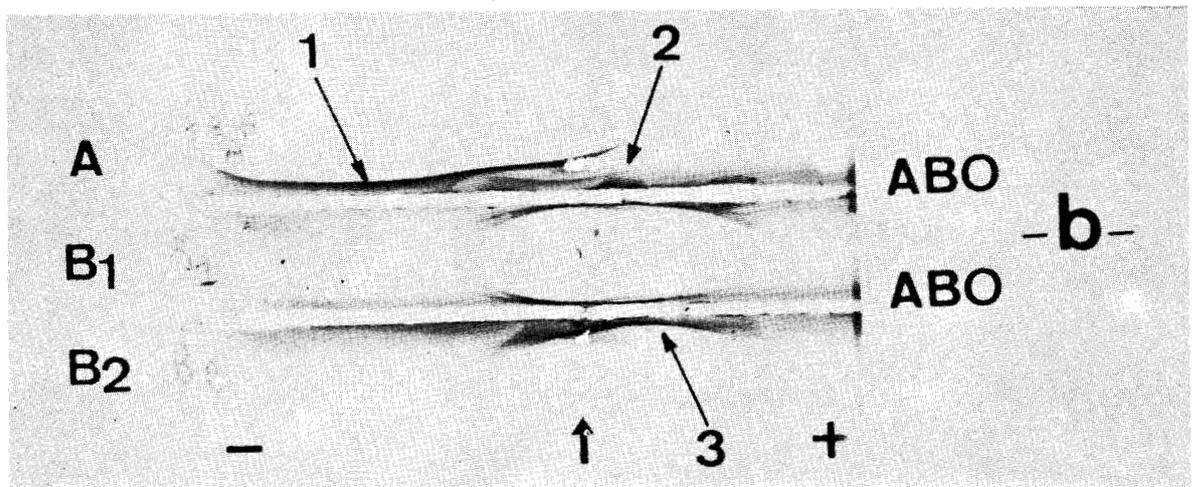
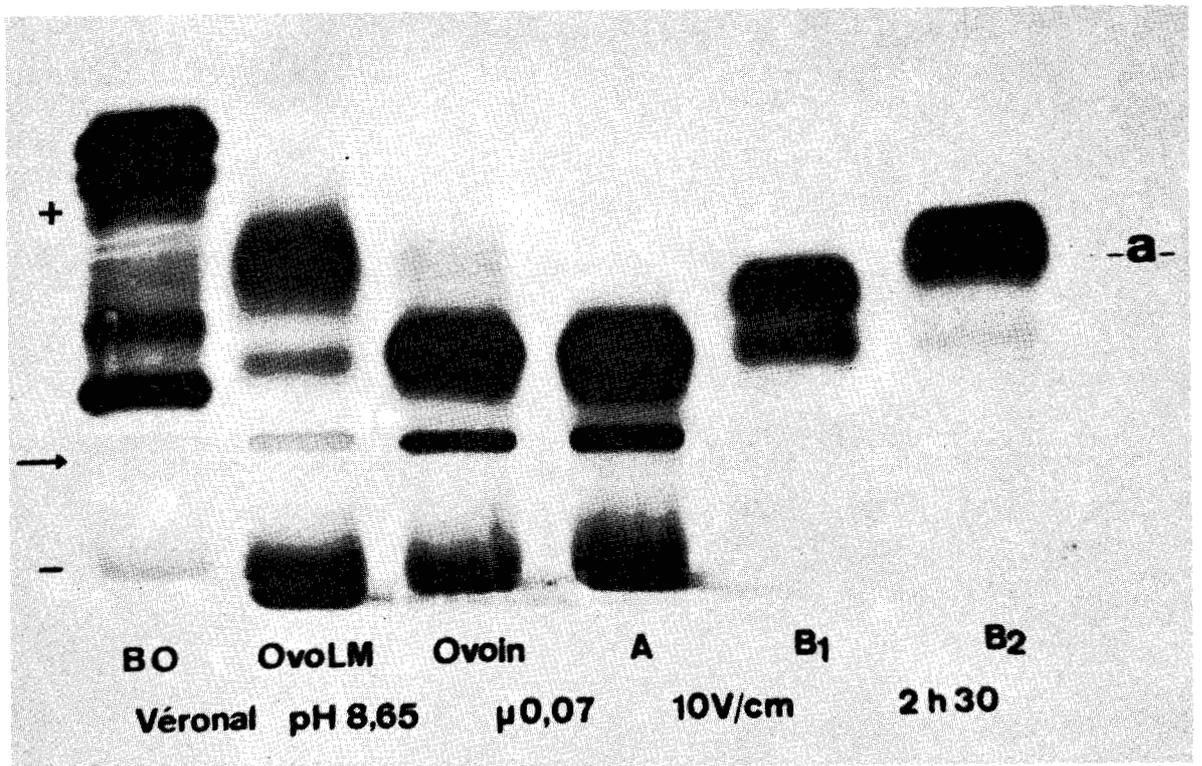


Figure 16

Electrophorèse sur acétate de cellulose (a) et immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose (Diagramme a de la figure 15 a ; p.62) de l'ovoinhibiteur préparé selon le procédé de TOMIMATSU *et al.*

Les électrophorégrammes ont été révélés par une coloration double à l'Amidoschwarz et à la nigrosine.

Pour la signification des abréviations, voir la légende de la figure 14 (p.59).

L'immuno-électrophorèse confirme ces résultats. La figure 16 b (p.63) représente les plaques révélées par l'Amidoschwarz après 24 heures de réaction avec le sérum antiprotéides du blanc d'oeuf total. La fraction A donne deux lignes de précipitation dont les comportements sont ceux d'un constituant cathodique γ (arc n° 1) et d'une globuline β_3 (arc n° 2). Les fractions B₁ et B₂ donnent les lignes d'une globuline β_3 et de l'ovomucoïde (arc n° 3).

2°- CHROMATOGRAPHIE DU PIC A-DEAE SUR CM-CELLULOSE.

Le diagramme de la figure 15 b (p.62) montre que la chromatographie du pic A-DEAE, sur CM-cellulose fournit deux sous-fractions A₁ et A₂ éluées respectivement avec le gradient continu de NaCl et avec le tampon acétate d'ammonium 0,1 M + NaCl 1 M de pH 4,6.

Le premier pic nous procure 330 ng de la fraction A₁ et le second 44 ng de la fraction A₂.

En électrophorèse sur acétate de cellulose (Figure 17 a ; p.65) la fraction A₁ est homogène et possède le comportement de l'ovoinhibiteur, tandis que la fraction A₂ contient un composant majeur qui migre comme le lysozyme vers la cathode.

En immuno-électrophorèse (plaques 1 et 2 ; Figure 17 b ; p.65) le constituant A₁ montre une ligne de précipitation unique de β_3 globuline ; la fraction A₂ montre cette même ligne très légère et une ligne cathodique de γ globuline très marquée. Sur la plaque 3 le réservoir d'antisérum a été raccourci du côté de la cathode. Le blanc d'oeuf et le lysozyme ont été déposés respectivement dans les trous inférieur et supérieur. On voit que l'arc de comportement cathodique γ du diagramme obtenu avec le blanc d'oeuf présente avec celui du lysozyme une réaction de parfaite identité. Une réaction analogue a été obtenue sur la plaque n° 4, entre la ligne de précipitation donnée par la fraction A₁ (trou inférieur) d'une part et la ligne de globuline β_3 présente sur l'immuno-électrophorégramme de l'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY (trou supérieur), d'autre part.

Enfin le protéide provenant du pic A₁ inhibe la trypsine, la chymotrypsine et la sustilisine (voir p. 84), tandis que la fraction A₂ possède une activité lysante, vis à vis d'une suspension de cellules de Micrococcus lysodeikticus, très voisine de celle du lysozyme pur. (figure 18 ; p.66). Les activités lysantes de la fraction A₂ et du lysozyme sont en effet respectivement égales à $9,8 \times 10^2$ et $12,8 \times 10^2$.

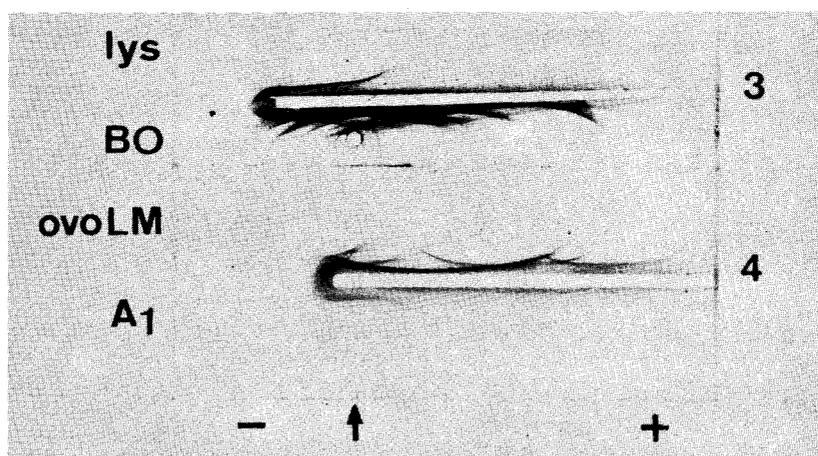
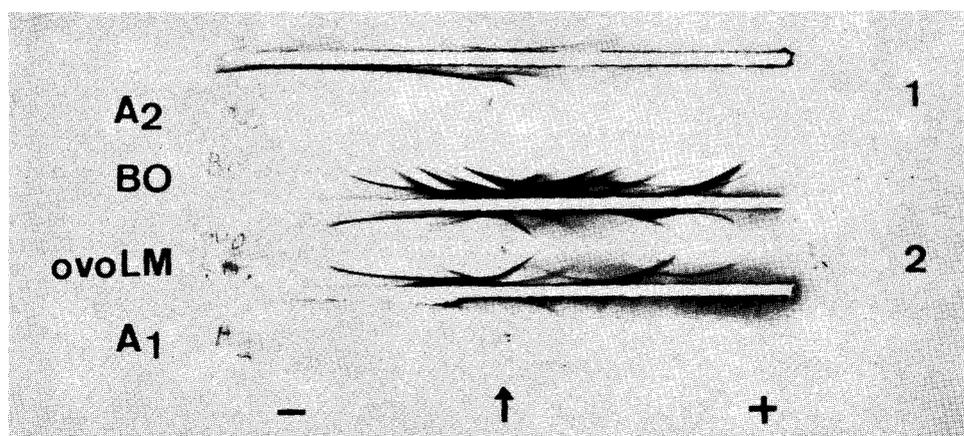
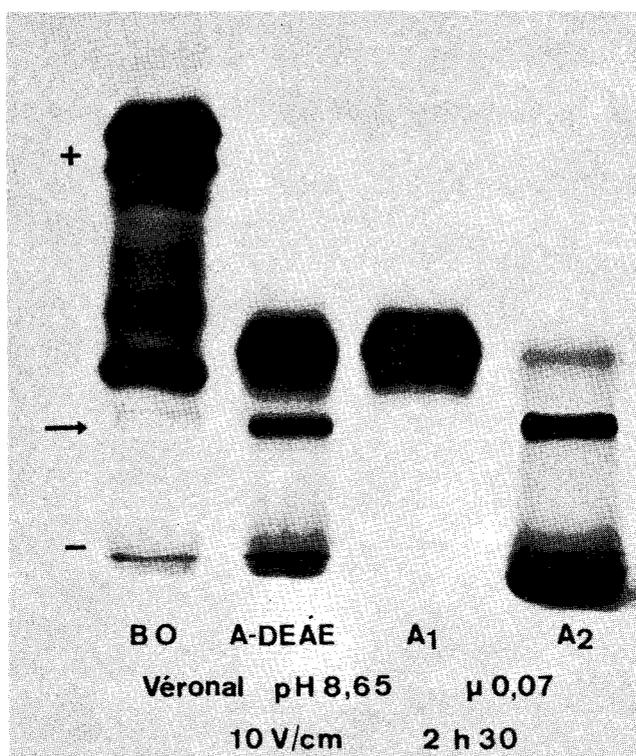


Figure 17

Electrophorèse sur acétate de cellulose (a) et immuno-électrophorèses (b) des fractions obtenues par chromatographie sur CM-cellulose (diagramme b de la Fig. 15 ; p.62) du pic A - DEAE. Les électrophorégrammes ont été révélés par une coloration double à l'Amidoschwarz et à la nigrosine. lys : lysozyme. Pour la signification des autres abréviations, voir la légende de la figure 14 (p.59).

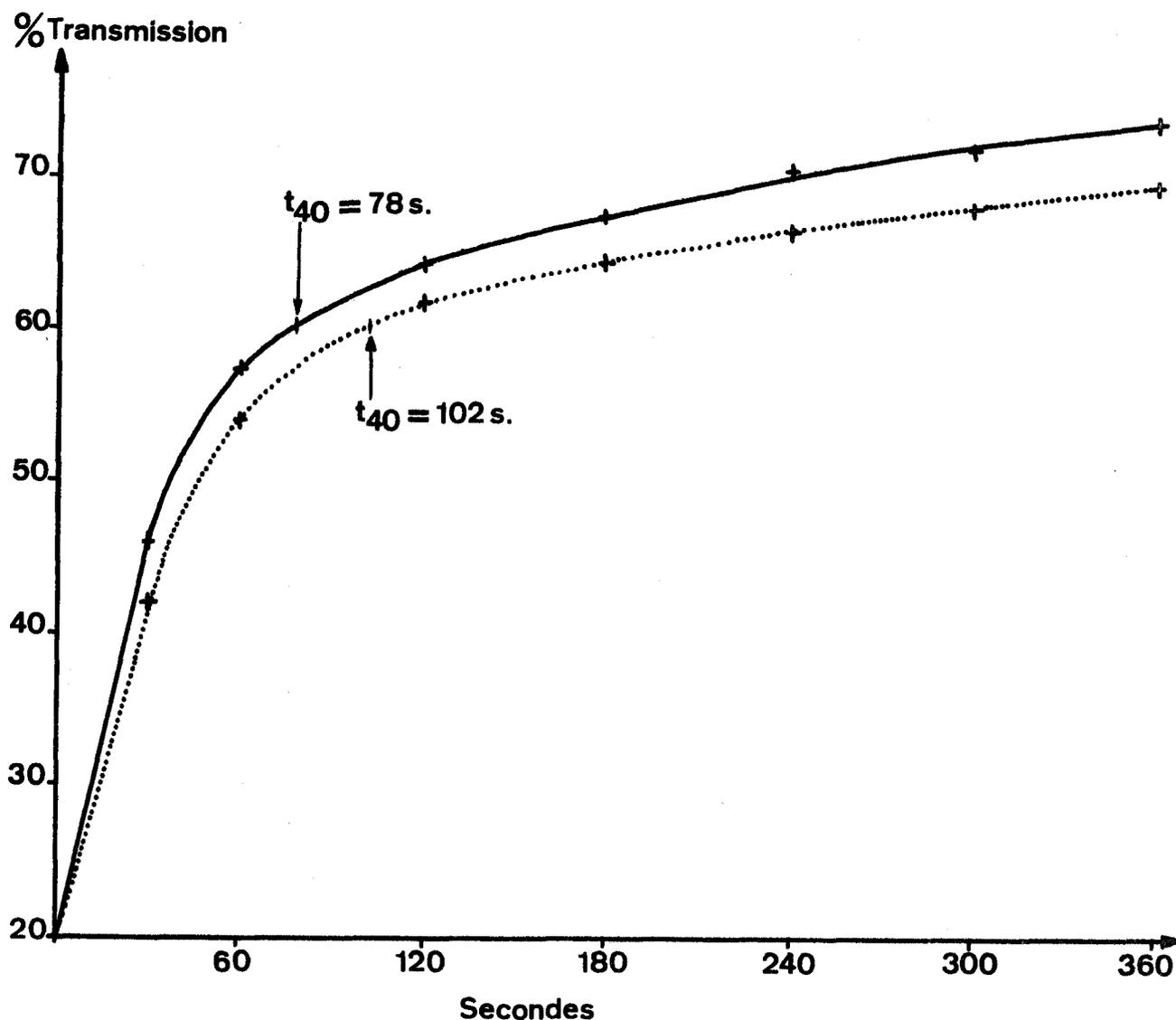


Figure 18

Lyse d'une suspension de cellules de Micrococcus lysodeikticus par le lysozyme pur (—) et la fraction A2 (.....).

Le trouble initial de la suspension est tel que la transmission à 650 nm soit de 20 p.100. L'activité lysante est évaluée d'après le temps nécessaire pour que la transmission augmente de 40 p.100. On appelle ce temps t_{40} et on définit l'activité "a" par la relation : $a = \frac{1}{t_{40}} \times 10^5$ (JOLLES et al. (377bis)).

D - CONCLUSIONS

La chromatographie sur DEAE-cellulose de l'ovoinhibiteur obtenu par le procédé de TOMIMATSU et al. fournit une fraction A qui soumise à la chromatographie sur CM-cellulose se dissocie en deux sous-fractions A₁ et A₂,

L'analyse électrophorétique et les activités spécifiques de ces deux sous-fractions démontrent que le pic A₁ contient l'ovoinhibiteur et le pic A₂ du lysozyme. Ces résultats associés à ceux de l'analyse immuno-électrophorétique nous autorisent à conclure que notre protocole expérimental de purification conduit à des préparations pures d'ovoinhibiteur à raison de 0,755 g par 60 g d'ovomucoïde de LINEWEAVER et MURRAY. (Les rendements des préparations de TOMIMATSU et al. étaient de 0,880 g pour la même quantité d'ovomucoïde traité). En outre, ils nous permettent d'identifier les lignes de précipitation de la β_3 globuline et du constituant cathodique γ , respectivement à la ligne de l'ovoinhibiteur et à celle du lysozyme.

III - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA PREPARATION DE L'OVONHIBITEUR.

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos recherches sur les méthodes de préparation de l'ovoinhibiteur sont les suivantes :

L'application à nos préparations d'ovomucoïde selon LINEWEAVER et MURRAY, du procédé par relargage par le sulfate d'ammonium de TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVICH nous a fourni des préparations d'ovoinhibiteur hétérogènes en électrophorèse et en immuno-électrophorèse.

L'emploi de deux fractionnements chromatographiques successifs sur DEAE-cellulose et sur CM-cellulose nous a permis d'obtenir des préparations pures d'ovoinhibiteur que nous avons utilisées pour nos études physico-chimiques et biologiques.

2 - PROPRIETES PHYSIQUES

I - ULTRACENTRIFUGATION.

A - RESULTATS

Les expériences de sédimentation ont été effectuées dans un tampon

phosphate 0,1 M de pH 7. L'ovoinhibiteur montre un seul pic symétrique (figure 19 ; p.69). La constante de sédimentation S_{20w}^0 , déterminée en extrapolant à une dilution infinie dans l'eau les valeurs obtenues à trois concentrations différentes est égale à 3,85. Cette valeur s'éloigne de celle de 3,31 définie par DAVIS et al. (377ter) avec un tampon phosphate 0,01 M de pH 6,5. La constante de diffusion libre D_{20w}^0 , que les auteurs précédents n'ont pas précisée a été trouvée égale à 6,58. Les mesures expérimentales par pycnométrie et le calcul d'après la composition de l'ovoinhibiteur nous ont fourni pour le volume spécifique partiel (\bar{v}) respectivement les valeurs de 0,699 et 0,701. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de DAVIS et al., mais s'écartent de ceux de TOMIMATSU et al. qui ont trouvé un volume spécifique partiel égal à 0,693.

B - CONCLUSIONS.

L'application de l'équation de SVEDBERG $M = \frac{S_{20w}^0}{D_{20w}^0} \times \frac{RT}{1-\bar{v}\rho}$ dans laquelle ρ est la densité du tampon, nous permet de calculer pour l'ovoinhibiteur une masse moléculaire de 48 700. Cette valeur s'accorde avec celle de 48 600 déterminée par DAVIS et al. par des mesures à l'équilibre de sédimentation.

II - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE.

Nous avons étudié le comportement de l'ovoinhibiteur en électrophorèse de zone (sur papier, en gélose et sur acétate de cellulose)* et en électrofocalisation dans des colonnes d'ampholytes.**

A - METHODES.

Les procédés que nous avons appliqués sont devenus tellement classiques que nous n'avons pas jugé utile de décrire leurs protocoles expérimentaux. Cependant, nous précisons brièvement les conditions particulières que nous avons employées pour l'électrofocalisation de l'ovoinhibiteur.

50 mg d'ovoinhibiteur ont été soumis à l'analyse pour laquelle nous avons utilisé une solution d'ampholytes qui permet de réaliser un gradient de pH entre 3 et 10. L'anode a été placée à la partie inférieure de la colonne et la cathode à la partie supérieure. La migration électrophorétique a été effectuée de la cathode vers l'anode sous une tension de 300 volts pendant 60 heures. A la fin de l'électrophorèse la colonne a été branchée

* Cellogel - CHEMETRON - MILAN ; SEBIA ; PARIS.

** Matériel et produits de marque L K B.

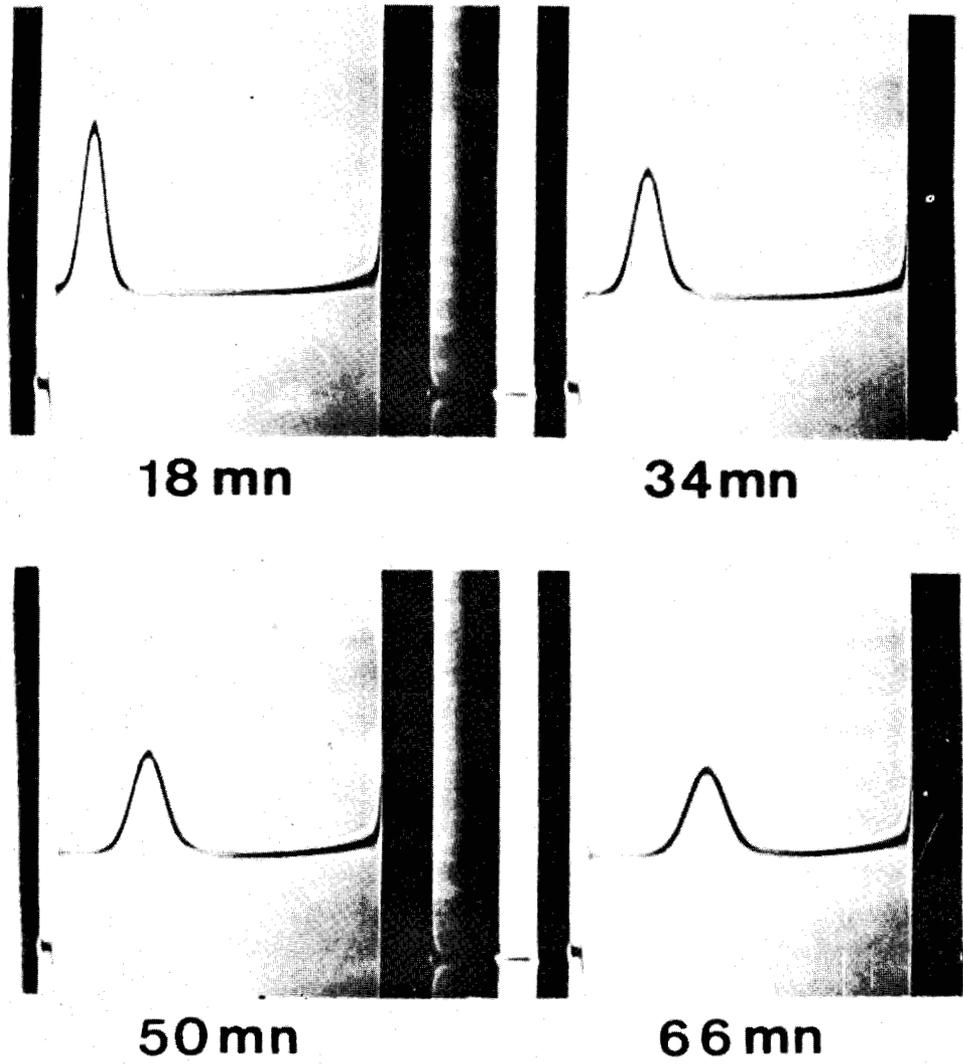


Figure 19

Diagrammes d'ultracentrifugation de l'ovoinhibiteur purifié par notre procédé personnel. Tampon phosphate 0,1 M de μ 0,1 et de pH 7 ; température : 20° C ; inclinaison de la barre 60° ; concentration 5 mg/ml.

à un collecteur de fractions, le débit réglé à 60 ml/h. et des fractions de 3 ml ont été recueillies. Les effluents de la colonne ont été analysés pour leur contenu en protéine par la mesure de la densité optique à 280 nm et le pH des fractions a été mesuré.

B - RESULTATS

1°- ELECTROPHORESE DE ZONE.

La figure 20 (p.71) illustre les résultats que nous avons obtenus.

a - L'électrophorèse sur papier montre que l'ovoinhibiteur donne une bande unique et migre vers l'anode à la même place que la conalbumine.

b - Electrophorèse en gélose. L'ovoinhibiteur (Fig. 20 ; p.71) forme une tache autour du réservoir d'origine indiquant un comportement de β_3 - globuline. Il se distingue de la conalbumine qui possède un comportement plus cathodique.

c - Electrophorèse sur acétate de cellulose. Dans un tampon véronal de pH 8,65 et de force ionique 0,07, l'ovoinhibiteur possède une mobilité plus anodique que la conalbumine et peut être facilement identifié à une bande présente sur l'électrophorèse du blanc d'oeuf total (Figure 20 ; p.71). Dans le tampon acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, il migre comme le lysozyme vers la cathode mais à une vitesse moindre (Figure 20 ; p.71).

2°- ELECTROFOCALISATION

L'examen de la figure 21 (p.72) montre que l'ovoinhibiteur soumis à l'analyse par électrofocalisation n'est pas élué en un pic homogène mais qu'il se dissocie en trois composants O_1 , O_2 et O_3 qui émergent de la colonne aux pH respectifs suivants : 5,9 ; 6,2 et 6,45.

C - CONCLUSIONS

En électrophorèse de zone et en tampon alcalin, l'ovoinhibiteur possède une mobilité électrophorétique légèrement anodique. En milieu acide il migre vers la cathode à une vitesse plus faible que le lysozyme. Sur papier, l'ovoinhibiteur migre comme la conalbumine, mais s'en dissocie en électrophorèse sur gel d'agar et d'acétate de cellulose.

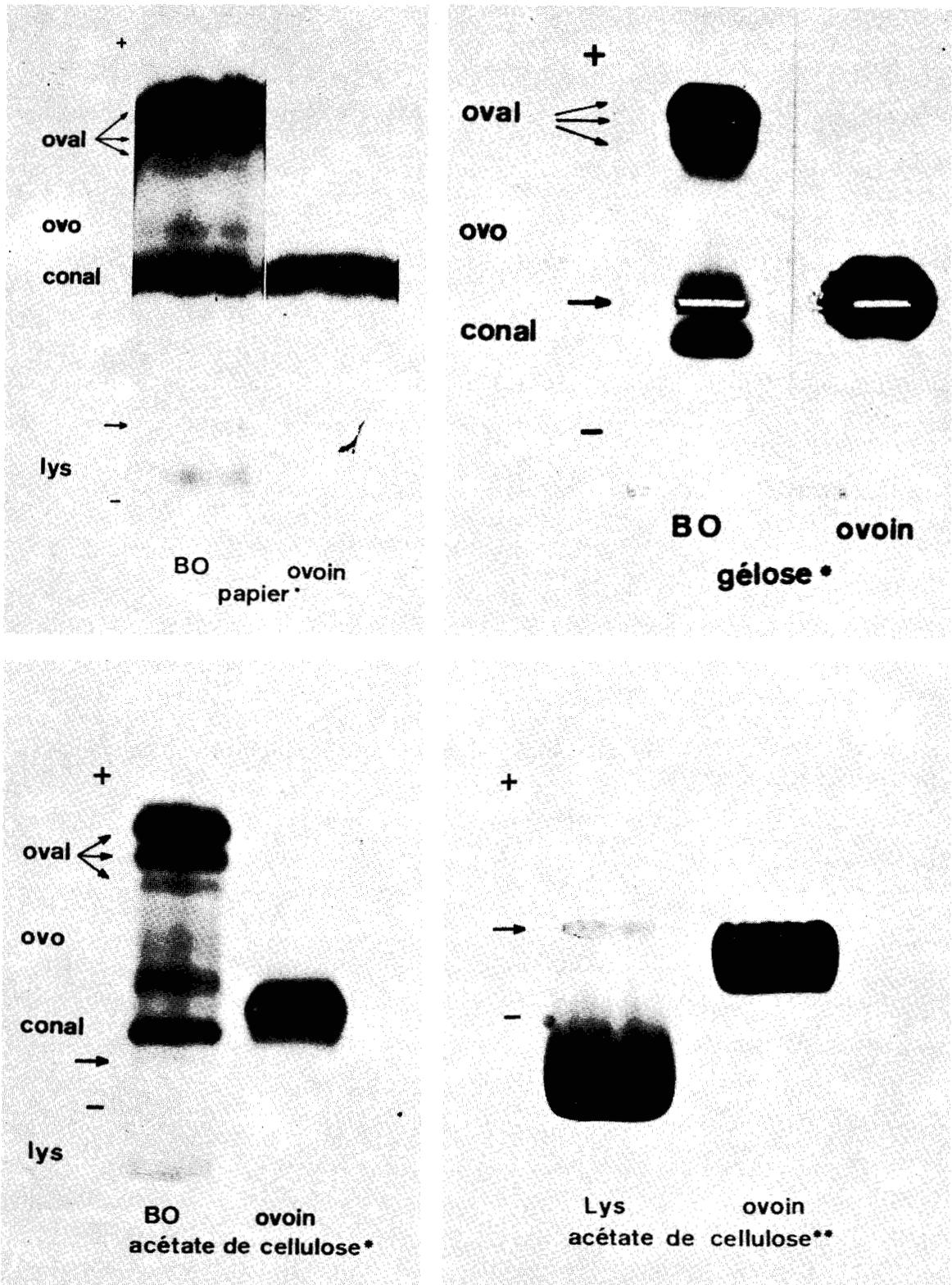


Figure 20

Electrophorégrammes sur papier, en gélose (révélation Amidoschwarz) et sur acétate de cellulose (double coloration à l'Amidoschwarz et à la nigrosine) de l'ovoïnhibiteur. BO : blanc d'oeuf total ; conal : conalbumine ;

lys : lysozyme ; oval : ovalbumine ; ovo : ovomucoïde ; ovoïn : ovoïnhibiteur.

* : tampon véronal de pH 8,65 ; μ 0,07.

** : tampon acétate d'ammonium 0,05 M ; pH 4,45.

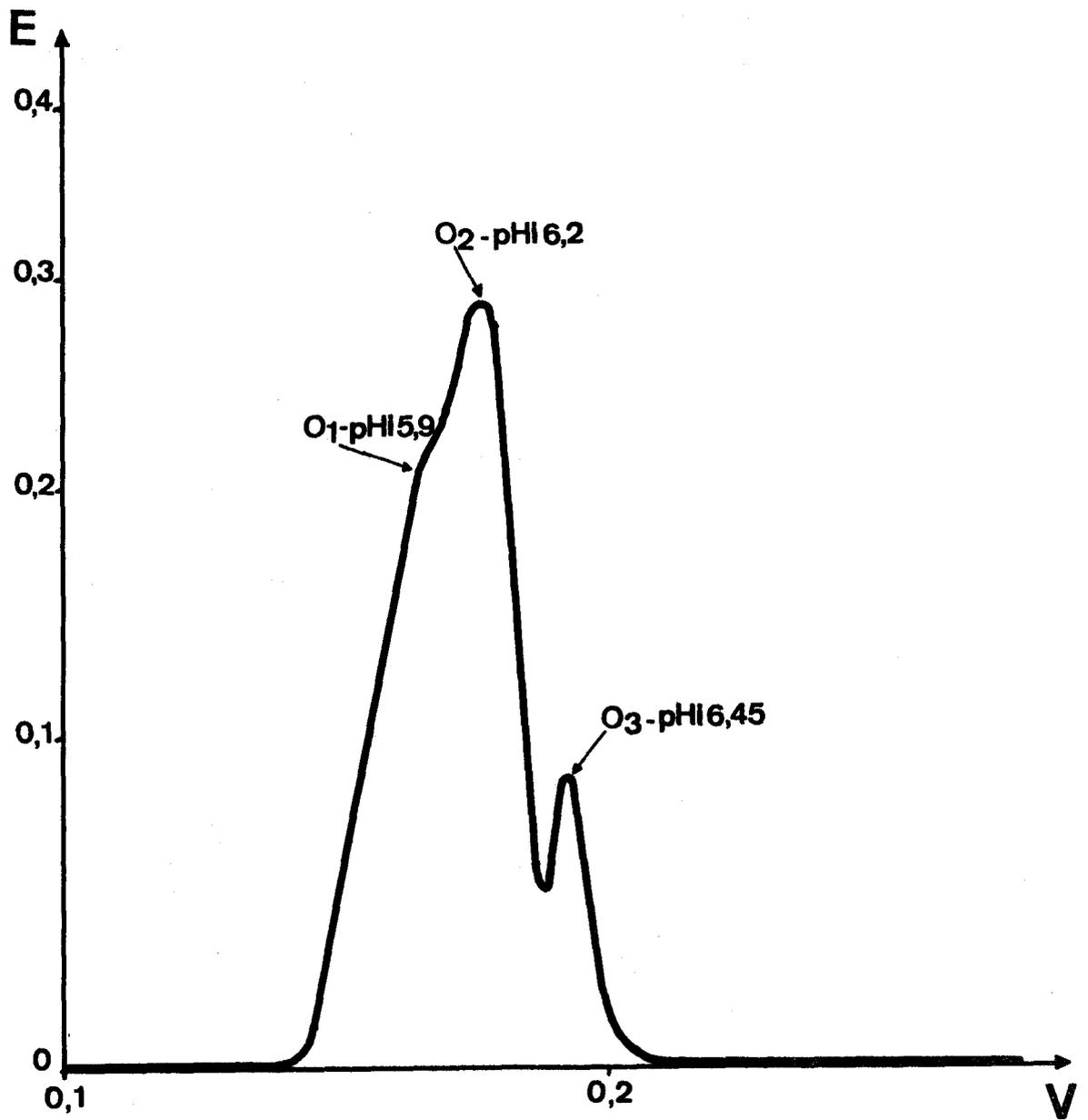


Figure 21

Electrofocalisation dans une solution d'ampholytes (pH 3 - 10) de l'ovoinhibiteur.

V : volumes des effluents exprimés en litres.

E : densité optique à 280 nm.

L'ovoinhibiteur reste homogène sur les supports d'électrophorèse que nous avons utilisés. Cependant, l'électrofocalisation nous a permis de caractériser trois espèces protéidiques dont les points isoélectriques respectifs sont 5,9 ; 6,2 et 6,45. Ce résultat confirme celui obtenu par TOMIMATSU et al. en électrophorèse sur gel d'amidon à haute tension. Il est également en accord avec les travaux récents de DAVIS, ZAHNLEY et DONOVAN (378) qui ont fractionné l'ovoinhibiteur en cinq composants par chromatographie de recyclage sur DEAE-cellulose. Ces auteurs ont caractérisé cinq fractions A, B, C, D et E par électrophorèse en gel de polyacrylamide ("disc electrophoresis"). Toutefois, les fractions A et B d'une part et les fractions D et E d'autre part se distinguent très peu l'une de l'autre. Selon les mêmes auteurs, les différences de charge qui expliquent cette hétérogénéité électrophorétique pourraient être dues aux différences de nombre et de localisation dans la chaîne polypeptidique des groupes β carboxyliques libres des résidus d'acide aspartique.

III - PROPRIETES OPTIQUES

A - ABSORPTION DE LA LUMIERE

Les courbes d'absorption de l'ultraviolet ont été déterminées en cuve de 1 cm d'épaisseur, sur des solutions de protéides à 0,1 g p.100 ml d'eau à pH 7. Elles révèlent un maximum d'absorption à 278 nm. D'après les valeurs obtenues à cette longueur d'onde, nous avons déterminé que le coefficient d'extinction $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ était égal à 6,25 ce qui correspond à un facteur optique de 0,160.

B - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE

Les mesures ont été effectuées à 546 nm sur des solutions à 1 g de protéides pour 100 ml d'eau distillée, ajustées à pH 7, à 20°C, à l'aide d'un micropolarimètre ZEISS. Dans ces conditions nous avons obtenu pour l'ovoinhibiteur un pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{546 \text{ nm}}^{20^\circ} - 97,5^\circ$.

C - CONCLUSIONS

1 - Les valeurs que nous avons obtenues pour le coefficient d'extinction en lumière ultraviolette de l'ovoinhibiteur s'éloignent de celles de TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVICH : $\epsilon \frac{1 \text{ p.100}}{278 \text{ nm}} = 7,40$, facteur optique : 1,35. Elles se rapprochent toutefois de certaines valeurs rapportées par DAVIS, ZAHNLEY et DONOVAN. Ces derniers auteurs ont trouvé, en effet, pour les fractions A, C, et D qu'ils ont isolées des coefficients d'extinction respectivement égaux à 6,7 ; 6,5 et 6,9 correspondant à des facteurs optiques de 0,149 ; 0,153 et 0,144.

2 - La mesure du pouvoir rotatoire spécifique nous a conduit à un résultat original qui demande donc à être confirmé.

3 - COMPOSITION CHIMIQUE

Nous envisagerons successivement la composition de la fraction glycannique et de la fraction protéidique en comparant nos résultats à ceux de TOMIMATSU et al. (379) et à ceux de DAVIS et al. (380).

I - COMPOSITION EN GLUCIDES

A - COMPOSITION CENTESIMALE

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau X (p.75). La comparaison de nos valeurs avec celles de TOMIMATSU et al. montre que les résultats sont du même ordre de grandeur. Toutefois, les différences peuvent s'expliquer, d'une manière générale par le degré de pureté des protéides soumis à l'analyse et par les méthodes de dosage employées.

- Dans le cas particulier de la teneur en oses "neutres", nous pouvons expliquer la différence entre les résultats par la composition des solutions de référence introduites dans les séries de dosage. En effet, SPIK (381), MONTREUIL et SPIK (382) et SPIK et MONTREUIL (383) ont démontré que, à quantités égales, les différents oses donnent des colorations dont les densités optiques varient dans de larges proportions. Avec le réactif à l'antrone sulfurique, utilisé par TOMIMATSU et al., le glucose absorbe à 585 nm, 2,3 fois plus que le mannose. Le témoin "interne", introduit dans les séries de dosage

Tableau X

Composition centésimale en glucides de l'ovoinhibiteur.

	Résultats personnels	Résultats de TOMIMATSU et al. (384)
Oses "neutres"	3,91	3,5
Osamines	3,87	2,7
Acide sialique		
- méthode à la diphénylamine	0,26	-
- méthode à l'acide thiobarbiturique	0	-

doit donc contenir les mêmes oses que ceux qui entrent dans la composition des glycoprotéides étudiés et dans des rapports de concentration identiques aux rapports molaires des différents oses préalablement déterminés par chromatographie sur papier. Or TOMIMATSU et al. ont dosé les hexoses en utilisant des solutions de glucose comme témoin "interne", alors que nous avons employé des solutions de galactose et de mannose dans les proportions 1:11. La teneur plus faible en oses "neutres" obtenue par ces auteurs s'explique donc aisément.

En outre, l'emploi d'une solution de référence identique à la nôtre aurait fourni à ces auteurs des teneurs en hexoses beaucoup plus élevées, ce qui est en faveur de la présence dans leurs préparations d'ovoinhibiteur de glycoprotéides contaminants riches en glucides.

- Les acides sialiques ont été dosés par deux méthodes différentes : celle de WERNER et ODIN (385) à la diphenylamine et celle d'AMINOFF (386) à l'acide thiobarbiturique, après hydrolyse sulfurique des liaisons "sialosyl".

L'application de la première méthode révèle la présence dans l'ovoinhibiteur de 0,26 p.100 d'acide sialique tandis que la seconde méthode nous a fourni un résultat nul.

TOMIMATSU et al. n'ont pas recherché la présence des acides sialiques. Quant à DAVIS et al., ils n'ont pas rapporté la composition centésimale mais seulement la composition molaire. C'est pourquoi nous discuterons ces résultats dans le paragraphe suivant.

B - COMPOSITION MOLAIRES.

L'application des méthodes d'identification et de dosages chromatographiques et électrophorétiques des oses, décrites dans la monographie de MONTREUIL et SPIK (386bis) nous a conduit aux résultats rassemblés dans le tableau XI (p.77) et illustrés en ce qui concerne l'osamine par la figure 22 (p.78).

1° - LES OSES "NEUTRES":

L'ovoinhibiteur contient 1 résidu de galactose et 11 résidus de mannose par mole, soit 12 résidus d'hexoses. Cette dernière valeur est supérieure à toutes celles obtenues par DAVIS et al. pour les fractions A, B, C et D (voir Tableau XI p.77). La discordance entre ces résultats peut s'expliquer, comme nous l'avons fait dans le paragraphe précédent, par le fait que DAVIS et al. n'ont pas introduit dans leurs dosages, de "témoins"

Tableau XI

Composition molaire en oses de l'ovoinhibiteur.

	Résultats personnels	Résultats de DAVIS et al. (387)				
		Fractions				
		A	B	C	D	E
Hexoses	12	9,7	10,2	7,7	5,6	-
Galactose	1	-	-	-	-	-
Mannose	11	-	-	-	-	-
N-acétylglucosamine	9	14	15,2	11	7,6	9
Acide N-acétylneuraminique	0 ou 0,43	0,2	-	0,4	0,5	-

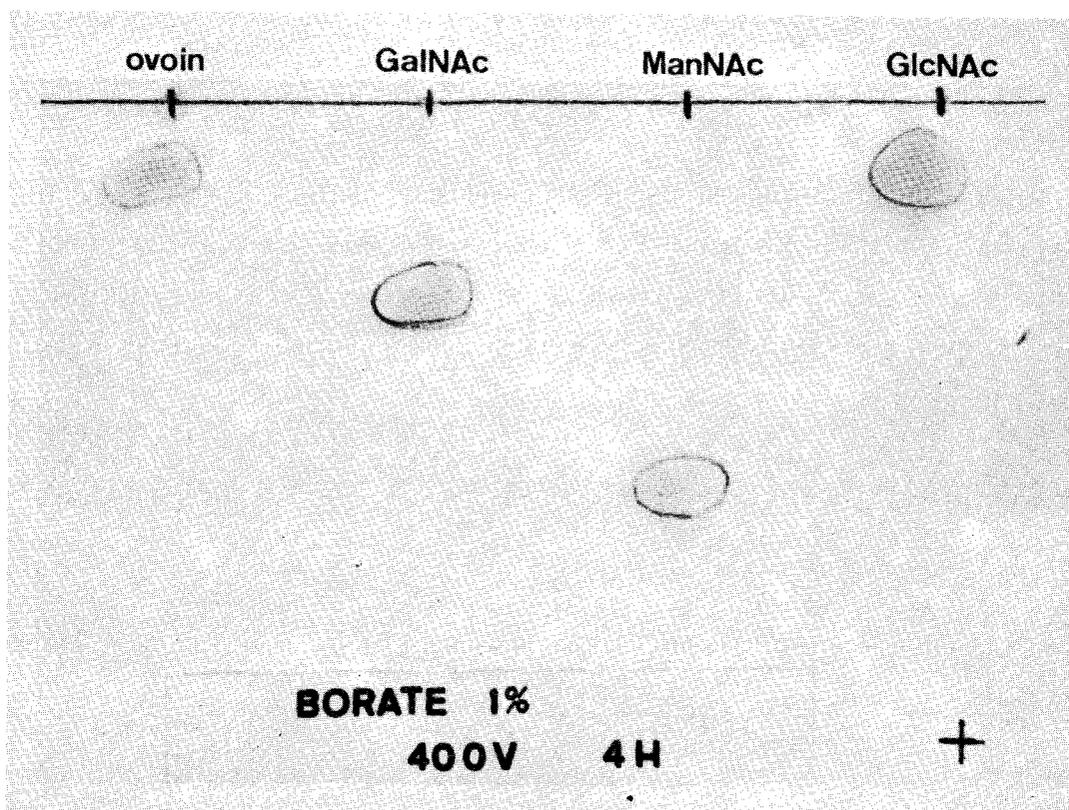


Figure 22

Comportement électrophorétique de la N-acétylosamine obtenue par N-réacétylation selon le procédé de ROSEMAN et LUDOWIEG (387bis) de l'osamine libérée par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N ; 100°C ; 4h) de l'ovoinhibiteur. Electrophorèse effectuée en cuve "en toit" en tampon borate de pH 9,2 (solution de tétraborate de sodium à 1 g p. 100ml), à 10 V/cm, pendant 4h. Révélation par la réaction d'EHRLICH "indirecte". T : solution témoin de N-acétylglucosamine (GlcNAc), de N-acétylgalactosamine (GalNAc) et de N-acétylmannosamine (ManNAc) pures.

internes de composition molaire identique à celle du glycanne de l'ovoinhibiteur. En effet, ces auteurs n'ont pas identifié les oses constitutifs et ont déduit la composition molaire en hexoses sur la base de la composition centésimale. Cette dernière a été déterminée par la méthode à l'orcinoï sulfureux avec, comme référence, des solutions de galactose alors que le mannose, qui est l'hexose prédominant, possède une absorbance molaire plus faible que le galactose (SPIK (388) ; MONTREUIL et SPIK (389) ; SPIK et MONTREUIL (390)).

2° - L'OSAMINE.

DAVIS et al. ont identifié et dosé les osamines en même temps que les acides aminés basiques en appliquant la méthode de MAXFIELD et STEFANYE (391). Ils ont montré qu'il s'agissait de la glucosamine seule.

Nous avons confirmé ce résultat par deux méthodes différentes :

- La désamination oxydative donne uniquement de l'arabinose.
- L'électrophorèse de l'osamine N-réacétylée révèle la présence exclusive de N-acétylglucosamine (Figure 22 ; p.78). Ce résultat, contrairement au précédent qui n'éliminait pas l'éventualité de la présence de mannosamine est sans ambiguïté.

Nous pouvons donc conclure, sur la base de la connaissance de la composition centésimale du protéide et de la valeur de 48 700 de sa masse moléculaire, qu'il existe 9 résidus de glucosamine dans l'ovoinhibiteur.

Ce résultat quantitatif s'éloigne de ceux de DAVIS et al., sans que nous puissions expliquer ce défaut de conformité.

3° - L'ACIDE SIALIQUE.

Dans le paragraphe précédent, dans lequel nous avons étudié la composition centésimale en glucides, nous avons vu que la teneur en acide sialique, déterminée par la méthode à la diphénylamine était de 0,26 p.100, soit 0,43 résidu par molécule de masse moléculaire 48 700. Toutefois, après hydrolyse sulfurique, l'application de la méthode d'AMINOFF à l'acide thio-barbiturique ne révèle pas la présence d'acide sialique.

En considérant le faible pourcentage en acide sialique d'une part, et le fait que l'hydrolyse des liaisons "sialosyl" n'est jamais quantitative, on peut expliquer la discordance des résultats fournis par les deux méthodes.

D'autre part, DAVIS et al., en utilisant la technique de WARREN (392) très voisine de celle d'AMINOFF ont déterminé que leurs fractions A,

C et D contiennent comme l'indique le Tableau XI (p.77) respectivement 0,2 ; 0,4 et 0,5 résidu d'acide sialique exprimé en acide N-acétylneuraminique. Les auteurs précisent, en outre, que les échantillons analysés ne contenaient que 0,6 à 0,7 μ g d'acide sialique.

Ces résultats ambigus peuvent être interprétés de deux manières différentes.

- L'ovoinhibiteur est dépourvu d'acide sialique, mais les préparations sont souillées par des traces de sialo-glycoprotéines.

- Les préparations sont pures (l'homogénéité immuno-électrophorétique de nos préparations est en cette faveur) et il faut alors admettre que les fractions obtenues par DAVIS et al. sont elles mêmes hétérogènes et constituées de glycoprotéines "immatures" par exemple et exempts d'acide sialique et de sialoglycoprotéines contenant un ou plusieurs restes "sialyl".

C - CONCLUSIONS.

De nos recherches sur la composition en glucides du glycanne de l'ovoinhibiteur nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1 - L'identification des oses "neutres", que les autres auteurs n'ont pas effectuée nous a permis de préciser la composition molaire en hexoses de l'ovoinhibiteur : 1 résidu de galactose et 11 résidus de mannose par mole.

2 - L'ovoinhibiteur contient une seule osamine : la N-acétylglucosamine. Notre résultat obtenu par l'application de deux méthodes différentes, confirme celui de DAVIS et al. . Toutefois, ces auteurs et nous-même avons utilisé des méthodes de dosage différentes qui nous ont conduit à des résultats quantitatifs discordants. Nos analyses révèlent la présence de 9 résidus mais des déterminations statistiques devraient être effectuées pour vérifier l'exactitude de ce résultat.

3 - Bien que la teneur en acide sialique soit faible et conduise à la détermination de moins d'un résidu par mole, sa présence dans l'ovoinhibiteur semble pouvoir être retenue si l'on tient compte de l'homogénéité immuno-électrophorétique de nos préparations.

II - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Nos recherches sur l'étude de la fraction protéique de l'ovoinhibiteur ont porté sur les deux points suivants :

- A - Détermination de la composition centésimale et molaire en acides aminés.
- B - Identification des acides aminés N_ et C_ terminaux.

A - DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XII (p.82) pour la composition centésimale, et dans le Tableau XIII (p.83) pour la composition molaire en acides aminés. Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

1° - COMPOSITION CENTESIMALE.

Nos résultats sont pratiquement identiques à ceux des autres auteurs et d'une manière générale situés à l'intérieur de la fourchette définie par les valeurs de TOMIMATSU et al. d'une part et celles de DAVIS et al. d'autre part, sauf pour l'histidine, la lysine, la cystéine, le glyco-
cocolle, la leucine et la proline pour lesquels nos valeurs sont légèrement supérieures.

2° - COMPOSITION MOLAIRE.

Les compositions molaires définies par nous même d'une part et par DAVIS et al. d'autre part ont seules été comparées car elles ont été calculées sur la base de masses moléculaires voisines. L'examen du Tableau XIII (p.83) montre des différences notables dans les nombres de résidus d'acide aspartique, de lysine, de glyco-
cocolle, de leucine, de thréonine et de valine.

B - DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX.

1° - AMINO-ACIDE N- TERMINAL.

Tableau XII

Composition en acides aminés de l'ovoinhibiteur exprimée en résidus d'acides aminés p. 10 000 g de protéide.

Nature des acides aminés	Résultats personnels	Résultats de TOMIMATSU <u>et al.</u> (393)	Résultats de DAVIS <u>et al.</u> (394)
Acide aspartique	8,68	7,68	9,67
Acide glutamique	7,74	6,25	7,90
Arginine	3,84	3,32	4,20
Histidine	3,13	2,30	2,93
Lysine	5,46	3,90	4,74
Alanine	3,94	3,37	4,02
Cystine / 2	7,45	4,13	6,96
Glycocolle	7,75	5,45	6,68
Isoleucine	3,09	2,87	3,53
Leucine	5,30	3,71	4,49
Méthionine	-	0,54	0,80
Phénylalanine	1,56	1,60	1,27
Proline	4,11	2,82	3,69
Sérine	5,16	4,29	5,56
Thréonine	5,93	5,20	6,69
Tryptophane	0,00	0,00	0,20
Tyrosine	3,24	2,15	3,49
Valine	4,63	4,30	5,44

Tableau XIII

Composition molaire en acides aminés de l'ovoinhibiteur. *

Nature des acides aminés	Résultats personnels	Résultats de DAVIS <u>et al.</u> (395)
Acide aspartique	42	47
Acide glutamique	38	39
Arginine	19	21
Histidine	15	14
Lysine	26 ou 27	23
Alanine	19	20
Cystine / 2	36	34
Glycocolle	38	32
Isoleucine	15	17
Leucine	26	22
Méthionine	-	4
Phénylalanine	7 ou 8	6
Proline	20	18
Sérine	25	27
Thréonine	29	33
Tryptophanne	0	<1
Tyrosine	16	17
Valine	22 ou 23	27

* : Pour une masse moléculaire de 48 700.

L'application des méthodes de dinitrophénylation de SANGER (396) et d'hydrolyse des DNP-glycoprotides de BISERTE, HOLLEMAN et coll. (397) nous a permis d'identifier un seul DNP-amino-acide : le DNP-valine. Aucun DNP-amino-acide hydrosoluble n'a été caractérisé dans la phase aqueuse (à l'exception bien sûr de l' ϵ -DNP-lysine).

2° - AMINO-ACIDE C- TERMINAL.

L'hydrazinolyse réalisée selon la méthode d'AKABORI et coll. (398) libère un seul amino-acide : la lysine.

C - CONCLUSIONS.

1° - La composition de l'ovoinhibiteur en acides aminés est mal définie puisque des différences notables existent entre les résultats obtenus, pour divers acides aminés, par nous même et les autres auteurs. Des déterminations nombreuses sur des échantillons différents devront être effectuées pour résoudre le problème.

2° - D'après les recherches que nous avons poursuivies pour déterminer les acides aminés en position N- et C- terminale, il semble que l'ovoinhibiteur ne contienne qu'un seul acide aminé N- terminal : la valine et un seul acide aminé C- terminal : la lysine.

Ces résultats originaux, n'ont pas reçu la confirmation des autres auteurs. Qualitatifs, ils demandent à être vérifiés et précisés par des déterminations quantitatives. Ils suggèrent toutefois que l'ovoinhibiteur est formé d'une seule chaîne peptidique. Cette conclusion est en accord avec celle tirée par DAVIS et al., des mesures de masse moléculaire. Ces auteurs ont montré en effet, que la masse moléculaire de l'ovoinhibiteur reste inchangée lorsque les déterminations à l'approche de l'équilibre de sédimentation sont conduites dans des tampons réducteurs dénaturants.

4 - INHIBITION DE LA TRYPSINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE

Lorsque nous avons entrepris nos recherches sur l'hétérogénéité de l'ovomucoïde qui nous ont conduit à nous intéresser à l'ovoinhibiteur,

l'inhibition des enzymes protéolytiques par ce protéide avait été peu étudiée et les résultats des déterminations quantitatives étaient discordants.

MATSUSHIMA (399) qui le premier a isolé du blanc d'oeuf, une préparation d'ovoinhibiteur lui reconnaissait une activité anti-trypsique plus efficace que celle de l'ovomucoïde et constatait qu'il s'unissait à la trypsine d'une manière stoechiométrique. Il remarquait également que l'ovoinhibiteur inhibait l'activité protéolytique de protéinases fongiques et bactériennes.

En 1963, FEENEY, STEVENS et OSUGA (400) ont montré que les activités de la trypsine et de la chymotrypsine sont inhibées lorsque les rapports pondéraux ovoinhibiteur / enzyme sont égaux à 1,47 et 1,60 respectivement. En 1966, TOMIMATSU et al. estimaient ces mêmes rapports à 1,05 et 1,10, valeurs qui correspondent à des rapports molaires de 1,90 et 1,70 ou en extrapolant au nombre entier le plus proche à un rapport molaire ovoinhibiteur / enzyme de 1 : 2 pour les deux enzymes. Pour la subtilisine, ces mêmes auteurs ont trouvé un rapport pondéral de 0,50. Mais en admettant avec JOHANSEN et OTTENSEN (401), la présence d'une quantité importante d'impuretés dans les préparations enzymatiques et en se fondant sur une masse moléculaire de 30 370 pour la subtilisine, ils concluaient à un rapport molaire de 1 : 2 également.

Les résultats les plus récents ont été obtenus par DAVIS et al. (402). Nous résumerons les conclusions de ces auteurs en comparant leurs résultats aux nôtres.

Nous envisagerons successivement :

- L'inhibition de l'activité estérasique de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine.
- L'inhibition de l'activité protéolytique de ces mêmes enzymes.
- L'étude électrophorétique des interactions entre ces trois enzymes et l'ovoinhibiteur.

I - INHIBITION DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE DE LA TRYPSINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE.

A - METHODE.

L'inhibition de l'activité estérasique des trois enzymes a été déterminée par la mesure de l'activité estérasique résiduelle dans des

mélanges d'enzyme et d'ovoinhibiteur, selon la méthode spectrophotométrique de RHODES, HILL et FEENEY (403).

Les substrats synthétiques employés ont été le TAME * pour la trypsine^a (3.4.4.4.) et l'ATEE** pour la chymotrypsine^a (3.4.4.5.) et la subtilisine^a, (subtilopeptidase A 3.4.4.16) extraite de Bacillus subtilis.

B - RESULTATS

L'examen des courbes de la figure 23 (p.87) montre que l'inhibition totale n'est pas obtenue qu'il s'agisse de la trypsine, de la chymotrypsine ou de la subtilisine.

Les courbes d'inhibition dévient de la linéarité pour un rapport pondéral ovoinhibiteur / enzyme légèrement inférieur à 0,5 pour la trypsine et la subtilisine et sensiblement égal à 0,85 pour la chymotrypsine. A ce moment, la trypsine et la subtilisine sont encore actives à 45 p.100 et 30 p.100 respectivement tandis que l'activité résiduelle de la chymotrypsine est tombée à moins de 20 p.100. Selon LASKOWSKI et LASKOWSKI (404) une plus grande déviation de la linéarité de la courbe d'inhibition aux forts rapports inhibiteur / enzyme est la preuve d'une moindre affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme.

Des trois enzymes estérasiques que nous avons étudiés, c'est donc pour la chymotrypsine que l'ovoinhibiteur montre les plus grandes affinités.

La quantité potentielle d'ovoinhibiteur qui inhibe totalement l'enzyme a été déterminée en extrapolant jusqu'à une activité nulle la partie linéaire de la courbe et par le calcul à partir des points de cette même portion de la courbe correspondant à 70 p.100 et 50 p.100 d'activité résiduelle de la trypsine et à 70 p.100, 50 p.100 et 30 p.100 d'activité résiduelle de la chymotrypsine et de la subtilisine. L'inhibition totale de 20 µg de trypsine, 30 µg de chymotrypsine et 30 µg de subtilisine serait ainsi obtenue avec 17,75 µg, 30 µg et 16,3 µg d'ovoinhibiteur, respectivement, soit pour des rapports pondéraux inhibiteur / enzyme égaux à 0,88 ; 1 et 0,55. Les masses moléculaires de la trypsine et de la chymotrypsine sont égales à 23 800 (DESNUELLE (405)) et à 25 100 (TRISTRAM et SMITH (406)).

* TAME : Tosyl arginine méthyl ester

** ATEE : Acétyl tyrosine éthyl ester

a - Fournisseur : MANN RESEARCH LABORATORIES ; trypsine : TRL, 2 X crystallised, salt free, lyophilised - 5300-897 ; chymotrypsine : CDI (bovine pancreas) 3 X crystallised, salt free, 5300-4767 ; subtilisine, crystalline, 5300-4487.

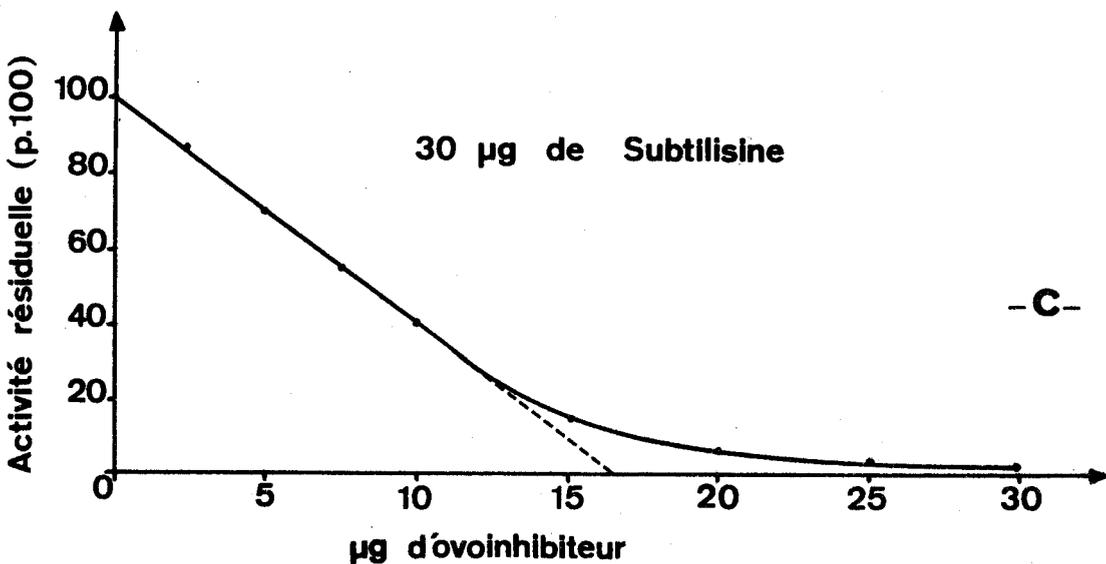
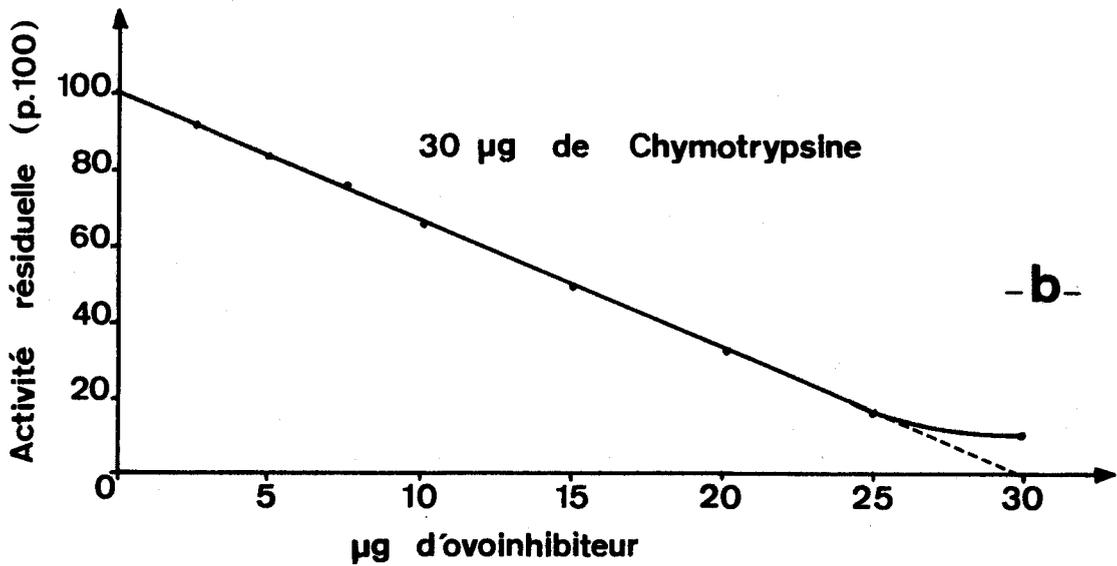
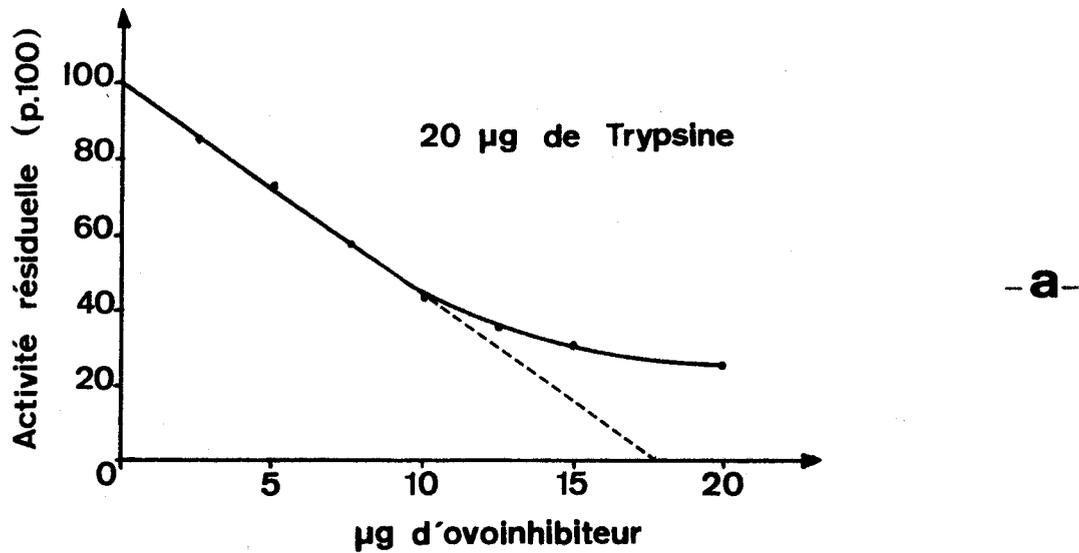


Figure 23

Activité estérasique de 20 μg de trypsine, 30 μg de chymotrypsine et 30 μg de subtilisine en présence de quantités croissantes d'ovoinhibiteur.

Substrats synthétiques utilisés : T A M E pour la trypsine

A T E E pour la chymotrypsine et la subtilisine.

Ces données associées à la connaissance du poids moléculaire de l'ovoinhibiteur et aux rapports pondéraux ovoinhibiteur / enzyme, donnent des rapports molaires enzyme / ovoinhibiteur de 2,30 et 1,94 respectivement ou en extrapolant au nombre entier le plus proche un rapport molaire de combinaison 1:2 pour les deux enzymes. En se fondant sur les conclusions de GREEN (407), de LASKOWSKI et LASKOWSKI (408) et de LEBOWITZ et LASKOWSKI (409), selon lesquelles l'inhibiteur tryptique du soja ne se combine qu'à la fraction active de l'enzyme, DAVIS et al. (410) ont admis que seules la trypsine active et la chymotrypsine active s'unissent à l'ovoinhibiteur. Ils ont déterminé par titration des sites actifs que leurs préparations enzymatiques ne contenaient que 71 p.100 de trypsine active et 83 p.100 de chymotrypsine active. Nous avons fait intervenir les mêmes facteurs de correction et l'examen du tableau XIV (p.89) montre que dans ces conditions les résultats de ces auteurs et les nôtres sont en bonne conformité.

Dans le cas de la subtilisine, le rapport pondéral ovoinhibiteur / subtilisine est faible. Ce résultat est conforme à celui de TOMIMATSU et al. (voir page 85). Si l'on admet pour la subtilisine la masse moléculaire de 30 370 proposée par JOHANSEN et OTTENSEN (411), le rapport molaire enzyme / ovoinhibiteur est égal à 3. Toutefois, ces derniers auteurs ont observé dans leur préparation la présence de produits d'autolyse. Si l'on considère que les préparations contiennent 35 p.100 d'impuretés inactives comme le suggèrent TOMIMATSU et al. et si l'on admet que seule la fraction active se combine à l'ovoinhibiteur, le rapport pondéral passe à 0,83 et le rapport molaire de combinaison subtilisine : ovoinhibiteur à 1,91.

C - CONCLUSIONS

L'ovoinhibiteur inhibe les activités estérasiqes de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine. Dans le cas de la trypsine et de la chymotrypsine le rapport molaire de combinaison ovoinhibiteur : enzyme peut être fixé à 1 : 2. Ces résultats confirment ceux obtenus par TOMIMATSU et al. (412) et par DAVIS et al. (413). Au contraire le rapport molaire subtilisine / ovoinhibiteur demeure incertain. En effet selon que l'on admet ou pas la présence d'impuretés inactives dans les préparations enzymatiques ce rapport passe de 2 à 3. Nous tenterons de préciser ce dernier point au cours de l'exposé des résultats de notre étude électrophorétique (voir page 96).

Tableau XIV

Rapports molaires correspondant à l'inhibition totale de l'activité estérasique de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine, par l'ovoinhibiteur.

	<u>Trypsine</u> Ovoïnhibiteur	<u>Chymotrypsine</u> Ovoïnhibiteur	<u>Subtilisine</u> Ovoïnhibiteur
Résultats personnels	2,30 1,63*	1,94 1,61*	2,95 1,91*
Résultats de DAVIS et al. (414)			
Fraction A	1,49	1,68	-
Fraction C	1,67	1,72	-
Fraction D	1,80	1,83	-

* En tenant compte de la quantité d'enzyme actif dans les préparations employées ; 71 p.100 de trypsine active, 83 p.100 de chymotrypsine active, 65 p.100 de subtilisine active.

II - INHIBITION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE LA TRYPISINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE.

A - METHODE

L'activité protéolytique de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine a été étudiée en mesurant l'inhibition de la digestion de la caséine "HAMMARSTEIN" en présence de quantités croissantes d'ovoinhibiteur selon le procédé général de KUNITZ (415).

B - RESULTATS.

Les courbes représentées à la figure 24 (p.91) illustrent les résultats que nous avons obtenus. De l'examen des courbes a et c, nous pouvons déduire que 23 μg et 13,75 μg d'ovoinhibiteur sont nécessaires pour inhiber totalement l'activité protéolytique de la trypsine et de la subtilisine ce qui correspond à des rapports ovoinhibiteur / enzyme en poids de 0,92 et 0,55 et des rapports molaires enzyme / ovoinhibiteur de 2,22 et 2,91 respectivement.

Ces résultats confirment ceux que nous avons obtenus précédemment avec les substrats synthétiques.

La courbe b représente l'inhibition de l'activité de la chymotrypsine. On voit que pour 25 μg d'ovoinhibiteur, quantité pour laquelle l'activité de la trypsine est minimale, la chymotrypsine possède encore une activité de 75 p.100. Pour obtenir une courbe représentative nous avons donc utilisé des concentrations en ovoinhibiteur 10 fois plus élevées. L'exploitation de la portion droite de la courbe permet de montrer que l'activité protéolytique de 25 μg de chymotrypsine est annulée lorsque 100 μg d'ovoinhibiteur sont introduits dans le mélange réactionnel soit pour un rapport pondéral chymotrypsine / ovoinhibiteur de 0,25, quatre fois plus faible que celui que nous avons obtenu en mesurant l'inhibition de l'activité estérasique avec un substrat synthétique.

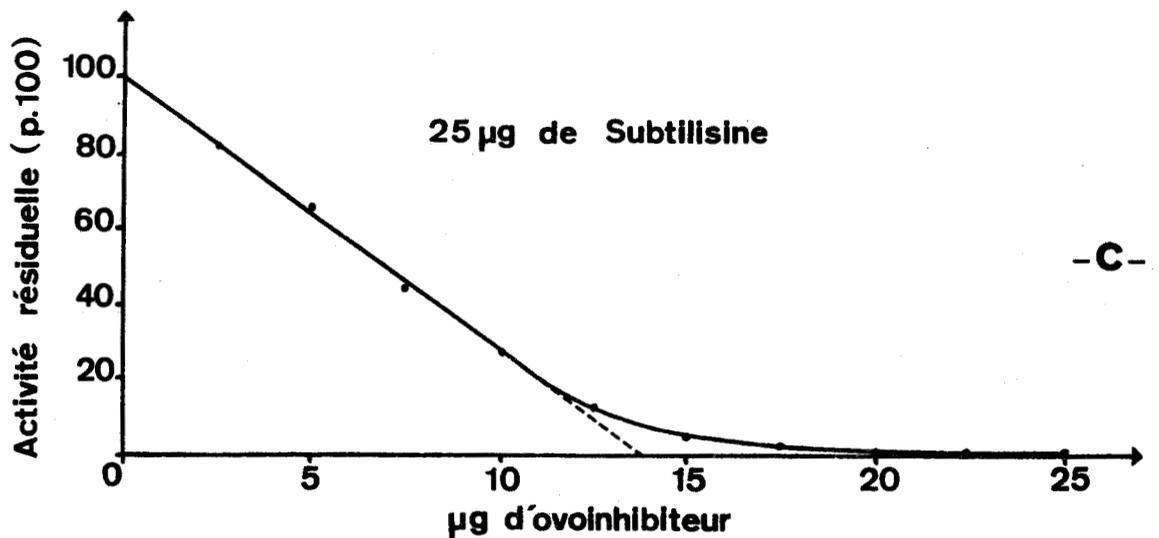
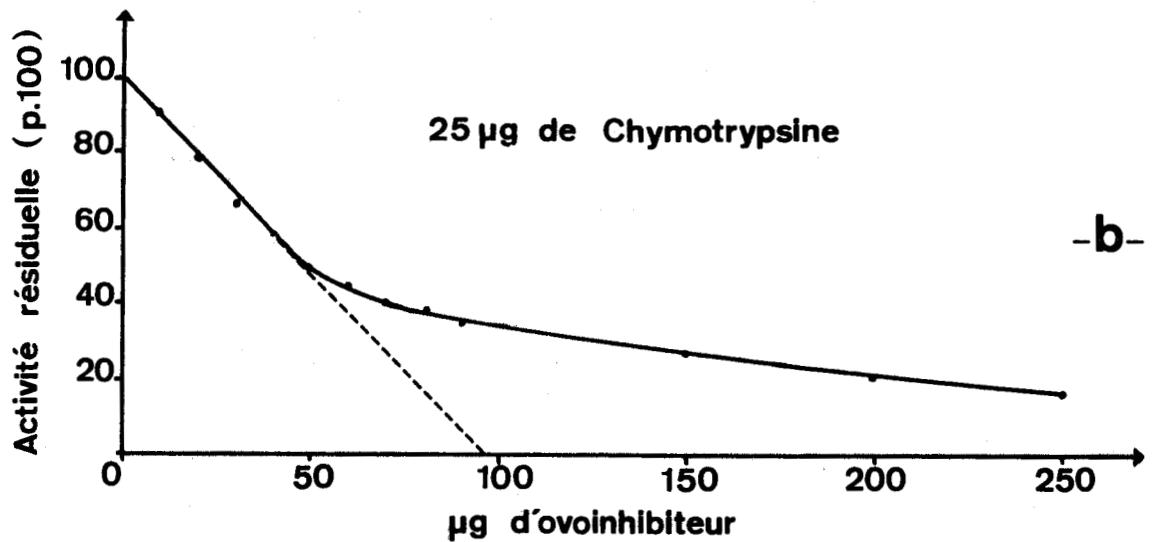
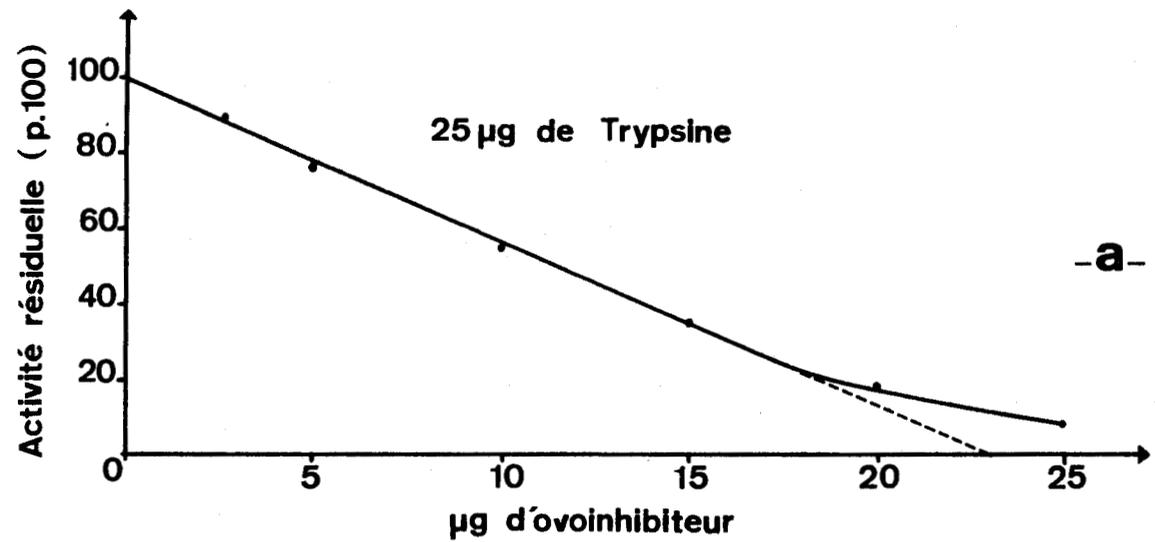


Figure 24

Activité protéolytique de 25 μg de trypsin, de chymotrypsine et de subtilisine en présence de quantités croissantes d'ovoinhibiteur. Substrat utilisé : Caséine "Hammarsten".

C - CONCLUSIONS.

L'étude de l'inhibition de l'activité protéolytique de la trypsine et de la subtilisine confirme les résultats obtenus précédemment. L'inhibition de la chymotrypsine conduit au contraire à des résultats très différents. Quatre fois plus d'ovoinhibiteur sont en effet nécessaires pour inhiber la chymotrypsine quand la caséine est employée comme substrat. Des résultats semblables ont été obtenus par RHODES, BENNETT et FEENEY (416) avec l'ovoinhibiteur de l'oeuf de Poule, l'ovomucoïde de l'oeuf de Pintade qui possède une activité anti-chymotrypsique et dans "certaines conditions expérimentales", avec l'ovomucoïde de l'oeuf de Cane.

Ces résultats n'ont fait jusqu'à présent, l'objet d'aucune recherche systématique et restent inexpliqués.

III - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES ET L'OVOINHIBITEUR.

A - METHODE.

Nous avons étudié le comportement électrophorétique des complexes formés par la combinaison de l'ovoinhibiteur avec la trypsine, la chymotrypsine et la subtilisine en adaptant à l'électrophorèse sur acétate de cellulose, les procédés sur gels d'amidon et de polyacrylamide décrits par OSUGA et FEENEY (417).

B - RESULTATS.

La figure 25 (p.93) montre que dans les conditions expérimentales utilisées, l'ovoinhibiteur migre vers l'anode, juste au dessus du dépôt, tandis que les trois enzymes étudiés possèdent un comportement cathodique. Les complexes formés par la combinaison des enzymes avec l'ovoinhibiteur ont un comportement intermédiaire et peuvent être ainsi facilement distingués.

1° - COMPLEXE : OVOINHIBITEUR-TRYPSINE.

La figure 25_a illustre les résultats obtenus avec la trypsine.

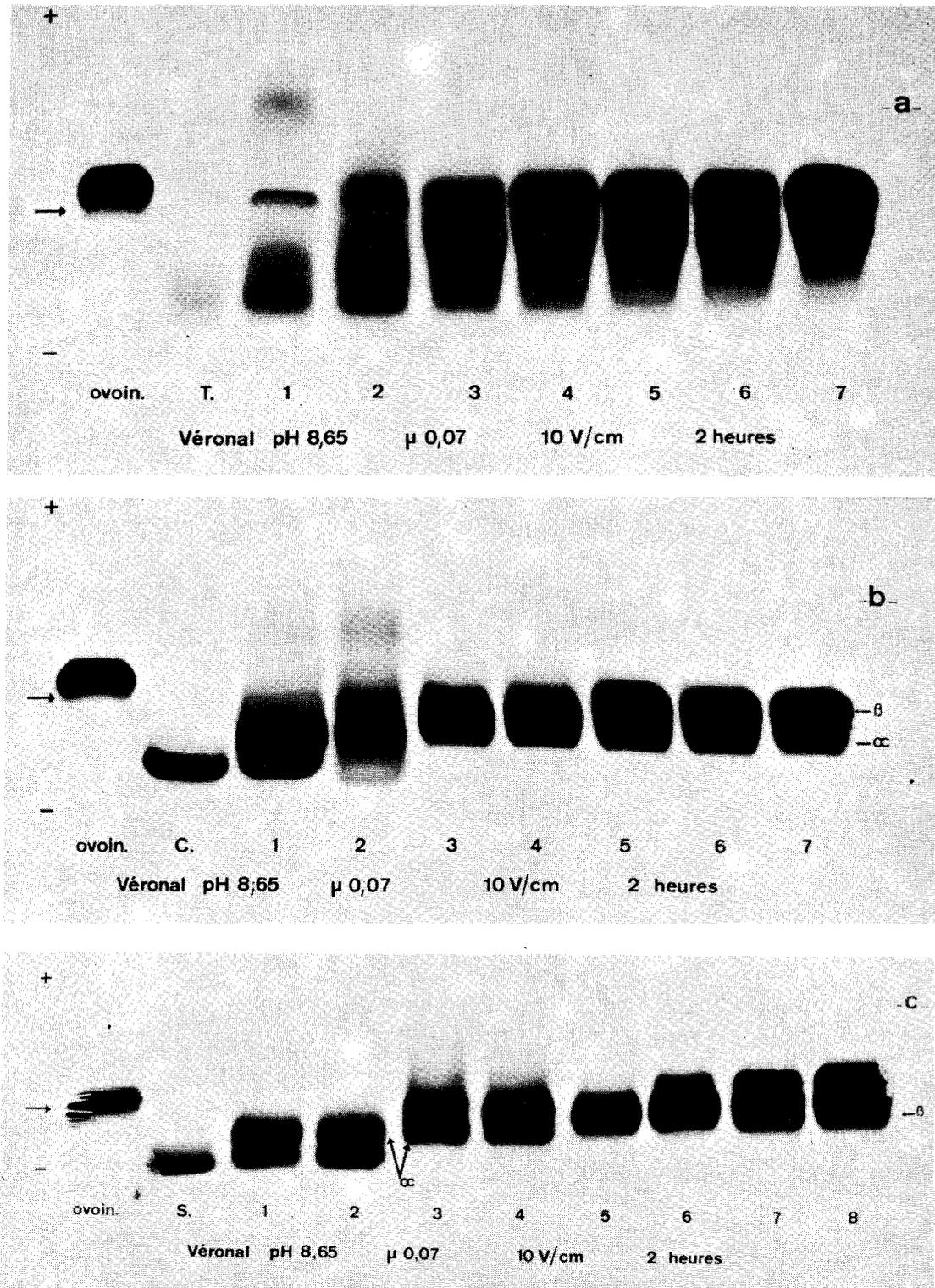


Figure 25

Electrophorèse sur acétate de cellulose de l'ovoinhibiteur (ovoin), de la trypsine (T), de la chymotrypsine (C), de la subtilisine (S) et de mélanges en proportions variables de l'ovoinhibiteur avec la trypsine (Fig. a), la chymotrypsine (Fig. b) et la subtilisine (Fig. c).

Les chiffres 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 désignent les rapports pondéraux ovoinhibiteur / enzyme (voir le texte p. 94 et 95).

Nous avons étudié des solutions contenant l'ovoinhibiteur et l'enzyme dans les rapports pondéraux 0,25 en 1 ; 0,50 en 2 ; 0,75 en 3 ; 1 en 4 ; 1,25 en 5 ; 1,50 en 6 et 2 en 7. On remarque qu'en 1 on ne décèle pas de bande au niveau de l'ovoinhibiteur, mais par contre une bande importante correspond à l'enzyme. En outre une tache de comportement intermédiaire est apparue : il s'agit d'un complexe enzyme-inhibiteur. Enfin, la tache de comportement anodique qui n'existe pas sur les diagrammes de l'ovoinhibiteur et de la trypsine, correspond probablement à l'ovoinhibiteur non combiné et partiellement hydrolysé.

En 2, la quantité d'inhibiteur a été doublée dans le mélange en réaction ce qui se traduit par une intensification du complexe, une atténuation considérable de la tache anodique dont la vitesse a en outre fortement diminué. Toutefois une bande d'ovoinhibiteur libre est apparue.

Dans les deux cas que nous venons de décrire, la bande qui migre au niveau de l'enzyme est, contre toute attente, plus intense que dans le témoin. On peut interpréter cette anomalie comme la conséquence d'une occupation très partielle des sites de l'enzyme par l'inhibiteur.

Sur les diagrammes suivants, les quantités d'ovoinhibiteur libre augmentent progressivement. Corrélativement les quantités d'enzyme libre diminuent, mais avec une amplitude moindre et sans jamais s'annuler. Quant au complexe enzyme-inhibiteur, il se distingue nettement de celui des deux premiers diagrammes par sa vitesse cathodique plus lente, mais reste apparemment identique à lui-même lorsque le rapport inhibiteur / enzyme varie de 0,75 à 2.

2° - COMPLEXE : OVOINHIBITEUR-CHYMOTRYPSINE.

Les diagrammes électrophorétiques de la figure 25b (p.93) résument notre étude de l'interaction entre l'ovoinhibiteur et la chymotrypsine.

Comme précédemment nous avons soumis à l'analyse électrophorétique des solutions renfermant l'ovoinhibiteur et la chymotrypsine dans les rapports pondéraux suivants : 0,25 (1) ; 0,5 (2) ; 0,75 (3) ; 1 (4) ; 1,25 (5) ; 1,50 (6) ; 2 (7). On voit que le complexe formé lorsque des poids égaux d'enzyme et d'inhibiteur sont en présence (4), donne une seule bande électrophorétique caractéristique dont le comportement est intermédiaire entre celui de l'ovoinhibiteur et celui de la chymotrypsine. La totalité des deux réactants a donc participé à la formation du complexe. En 1 et en 2 l'enzyme est en excès par rapport à l'inhibiteur, ce qui se traduit par la présence d'une bande au niveau de la chymotrypsine, d'une traînée en direction de

l'anode et de deux complexes. L'un plus important en 2 qu'en 1, correspond à celui qui apparaît quand le rapport pondéral est égal à 0,75 et qui persiste ensuite. L'autre donne une tache très intense et possède une vitesse cathodique plus grande. Enfin en 5 ; 6 et 7, on distingue deux bandes α et β correspondant respectivement au complexe et à l'ovoinhibiteur en excès. Aucune bande ne peut être décelée au niveau de la chymotrypsine qui a donc été entièrement saturée par l'inhibiteur.

3° - COMPLEXE : OVOINHIBITEUR-SUBTILISINE.

L'analyse des complexes formés par la subtilisine et l'ovoinhibiteur est illustrée par la figure 25c (p.93).

Les diagrammes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, et 8 correspondent aux dépôts de mélanges d'ovoinhibiteur et d'enzyme respectivement dans des rapports pondéraux égaux à 0,25 ; 0,35 ; 0,50 ; 0,55 ; 0,8 ; 1 ; 1,25 ; et 1,50. Comme dans les deux cas précédents, il se forme successivement deux complexes différents lorsque le rapport ovoinhibiteur / subtilisine augmente. Sur les diagrammes 1 et 2, on voit qu'une partie de l'enzyme est restée libre, tandis que la totalité de l'ovoinhibiteur s'est combinée à la subtilisine pour former un premier complexe (bande α). Sur les diagrammes 3 et 4 qui correspondent à des mélanges d'ovoinhibiteur et d'enzyme dans les rapports 0,50 et 0,55 on ne décèle plus d'enzyme libre, la bande α s'affaiblit et parallèlement un deuxième complexe se forme (bande β). Lorsque le rapport ovoinhibiteur / enzyme est égal à 0,80 (diagramme n° 5) seul le deuxième complexe se forme et persiste ensuite invariablement lorsque la quantité d'ovoinhibiteur dans le mélange augmente et devient excédentaire par rapport à la quantité d'enzyme (diagrammes 6, 7 et 8).

Il faut remarquer, en outre, que le diagramme 4 a été obtenu avec un mélange d'enzyme et d'ovoinhibiteur équivalent à celui qui correspond, d'après la courbe d'inhibition de la figure 23 c (p.87) à l'inactivation totale de la subtilisine.

C - CONCLUSIONS

L'ovoinhibiteur forme avec la trypsine, la chymotrypsine et la subtilisine des complexes dont les vitesses de migration électrophorétique sont intermédiaires entre celle de l'ovoinhibiteur et celles des enzymes.

Lorsque les rapports pondéraux ovo-inhibiteur / trypsine et ovo-inhibiteur / chymotrypsine sont égaux ou inférieurs à 0,50 et les rapports ovo-inhibiteur / subtilisine égaux ou inférieurs à 0,35, il se forme un premier complexe auquel se substitue un second complexe de vitesse cathodique plus faible dès que le rapport pondéral est égal à 0,75 ou 0,80. On peut donc admettre que ces deux complexes qui apparaissent successivement correspondent à deux degrés différents de saturation des sites actifs de l'enzyme présent dans le mélange réactionnel.

La présence de trypsine et d'ovo-inhibiteur libres sur les électrophorogrammes confirme que la trypsine utilisée contenait des impuretés inactives, incapables de se combiner à l'ovo-inhibiteur, et dont il faut tenir compte pour établir les rapports molaires de combinaison. Le complexe obtenu avec des mélanges en proportions égales de chymotrypsine et d'ovo-inhibiteur montre en électrophorèse une seule bande sans qu'il soit possible de déceler de l'enzyme ou de l'ovo-inhibiteur libre. Ce résultat associé à ceux de la mesure de l'activité résiduelle suggère que la préparation enzymatique que nous avons employée était très pure et que le rapport molaire de combinaison peut être déduit, sans correction, de la courbe d'inhibition.

L'analyse électrophorétique du mélange d'ovo-inhibiteur et de subtilisine dans les proportions qui correspondent à l'inhibition totale de la subtilisine (poids d'ovo-inhibiteur / poids d'enzyme = 0,55 ; voir p.86) ne montre ni ovo-inhibiteur, ni subtilisine libre. Nous pouvons donc conclure que la préparation de subtilisine est totalement inhibée pour un rapport molaire ovo-inhibiteur : enzyme de 1 : 3. Des rapports molaires de combinaison inhibiteur-enzyme supérieurs à 1 : 2 ont également été trouvés avec l'inhibiteur chymotrypsique de la pomme de terre qui se combine à 4 molécules de l'enzyme*. Cette conclusion est en désaccord avec celle de TOMIMATSU et al. et il nous faut bien admettre soit que la préparation de subtilisine que nous avons utilisée était très pure, soit que l'ovo-inhibiteur se combine à la totalité de la préparation enzymatique aussi bien avec la fraction active qu'avec la fraction inactive. Cette dernière hypothèse s'éloigne de l'opinion généralement admise que les inhibiteurs ne peuvent se combiner qu'avec la fraction active des enzymes ; elle demande à être vérifiée par une étude de l'interaction entre l'ovo-inhibiteur et un enzyme catalytiquement inactif. Une troisième hypothèse enfin ne peut pas être exclue a priori ; il est possible en effet que la valeur de 30 370 proposée par JOHANSEN et OTTENSEN, comme masse moléculaire de la subtilisine soit inexacte. Une masse moléculaire voisine de 45 000 conduirait alors à un rapport molaire de combinaison de 1 : 2.

* BALLS et RYAN (417bis).

IV - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'INHIBITION DES ENZYMES PAR L'OVOINHIBITEUR.

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre étude sur l'inhibition de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine par l'ovoinhibiteur sont les suivantes :

A - La détermination des courbes d'activité estérasique et protéolytique résiduelle des trois enzymes en fonction de quantités croissantes d'ovoinhibiteur confirme les résultats obtenus par TOMIMATSU et al. et par DAVIS et al..

B - L'analyse électrophorétique de l'interaction entre l'ovoinhibiteur et les trois enzymes, que les auteurs précédents n'ont pas effectuée, nous a conduit à des résultats originaux qui nous ont permis de préciser deux points.

1° - L'ovoinhibiteur se combine à la trypsine, à la chymotrypsine et à la subtilisine en formant successivement deux complexes qui se distinguent par leur comportement électrophorétique et leurs proportions relatives, quand le rapport pondéral ovoinhibiteur / enzyme croît de 0,25 à 1. Nous pouvons interpréter cette hétérogénéité comme le résultat d'une saturation croissante de l'ovoinhibiteur par l'enzyme.

2° - Les préparations de trypsine contiennent une fraction inactive importante, tandis que les préparations de chymotrypsine apparaissent très pures. Dans le cas de la subtilisine, les résultats sont plus difficilement interprétables. En effet, le rapport pour lequel l'enzyme est totalement inhibé est bien inférieur à celui pour lequel il se forme avec l'ovoinhibiteur une combinaison "stable". Le rapport molaire de combinaison avec l'ovoinhibiteur semble toutefois pouvoir être fixé à 3, alors qu'il est égal à 2 pour la trypsine et la chymotrypsine.

5 - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE L'OVOINHIBITEUR.

L'application du procédé de TOMIMATSU, CLARY et BARTULOVICH de préparation de l'ovoinhibiteur ne fournit pas une préparation homogène en immuno-électrophorèse. La chromatographie sur DEAE-cellulose puis sur CM-cellulose, nous a permis d'obtenir des préparations pures d'ovoinhibiteur dont nous avons caractérisé la ligne de précipitation en immuno-électrophorèse.

Nos recherches sur les propriétés physiques de l'ovoinhibiteur confirment en général les résultats obtenus par DAVIS, ZAHNLEY et DONOVAN. Nous avons toutefois obtenu les résultats originaux suivants :

- Constante de diffusion : $D_{20w}^0 = 6,58$.
- Point isoélectrique de 3 fractions caractérisées par électrofocalisation : 5,9 ; 6,2 et 6,45.
- Pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_{546 \text{ nm}}^{20^\circ} = - 97^\circ 5$

Nous avons, pour la première fois, identifié les glucides constituant les fractions glycaniques de l'ovoinhibiteur. Il s'agit du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique. Les résultats que nous avons obtenus, concernant la composition en oses "neutres" en particulier, ne sont pas en accord avec ceux de DAVIS et al.. Cette discordance peut s'expliquer par le fait que les auteurs précédents ont utilisé des solutions de galactose comme référence alors que le mannose dont l'extinction molaire est différente, représente l'hexose prédominant puisque le rapport mannose / galactose est égal à 11.

La détermination de la composition en acides aminés nous a permis de confirmer les résultats de DAVIS et al.. Les légères différences de teneur qui subsistent ne devraient pas résister à des analyses statistiques. D'autre part, nous avons établi, et ces résultats sont originaux, que les groupements N- et C- terminaux de l'ovoinhibiteur sont respectivement la valine et la lysine.

Nous avons repris le problème de l'inhibition des enzymes par l'ovoinhibiteur. Deux molécules de trypsine ou de chymotrypsine ou trois molécules de subtilisine se combinent à l'ovoinhibiteur. L'étude électrophorétique des complexes formés révèle leur hétérogénéité qui est fonction du rapport pondéral inhibiteur / enzyme.

L'OVOLYCOPROTEINE DE KETTERER

1 - PREPARATION.

Nous avons vu dans le chapitre consacré aux généralités (p.11) que KETTERER avait isolé du blanc d'oeuf de Poule un glycoprotéide : l'ovoglycoprotéine, par chromatographie sur gel d'apatite de l'ovomucoïde préparé selon le procédé de FORSYTHE et FOSTER (418). Nous avons appliqué le mode opératoire décrit par l'auteur pour tenter d'isoler cette glycoprotéine de manière à étudier son comportement électrophorétique et immuno-électrophorétique et à préciser ses propriétés physico-chimiques. Nous avons, en outre, essayé d'améliorer ce procédé de préparation.

Nous décrivons donc successivement :

- 1 - Le procédé de KETTERER
- 2 - Les modifications de la méthode de KETTERER
- 3 - Un procédé personnel.



I - APPLICATION DU PROCEDE ORIGINAL DE KETTERER

A - MODE OPERATOIRE.

1° - PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA METHODE DE FORSYTHE ET FOSTER (419).

A 3 100 ml de blanc d'oeuf homogénéisé, on ajoute du chlorure de sodium (solution finale 0,15 M en NaCl). La solution de protéides, refroidie à 0°C, est soumise à un fractionnement par un gradient de concentration en éthanol associé à un gradient de pH, suivant le schéma de la figure 26 (p.100). L'ovomucoïde précipite à pH 4,6 lorsque la concentration en alcool atteint 70 p.100.

Le fractionnement fournit 16 à 18 g d'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER.

2° - FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE L'OVOMUCOÏDE DE FORSYTHE ET FOSTER SELON LE PROCEDE DE KETTERER. (420)

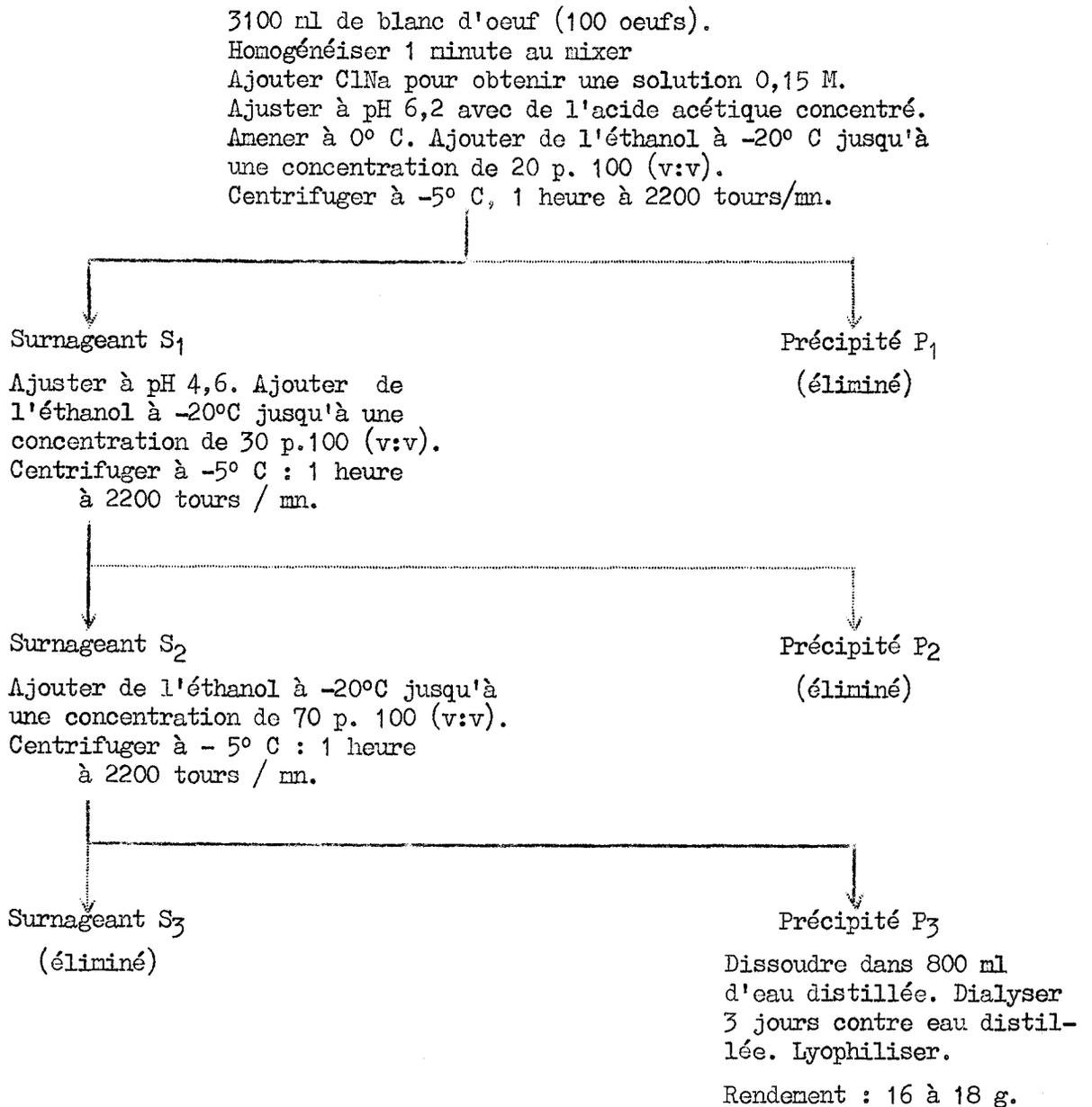


Figure 26

Schéma de préparation de l'ovomucoïde selon le procédé de FORSYTHE et FOSTER (421).

Nota : La totalité du fractionnement se déroule à - 5° C.

16 g d'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER sont dissous dans 400 ml d'une solution de phosphate de sodium 0,001 M tamponnée à pH 5,5. La solution obtenue est additionnée, sous agitation constante, de gel d'hydroxylapatite (a), ajouté par fractions de 100 ml environ toutes les 10 minutes jusqu'à ce que l'ovoglycoprotéine soit totalement absorbée. Cette opération est suivie par électrophorèse sur papier (électrophorèse en toit ; 2 h à 10 V / cm) effectuée après chaque addition sur 30 μ l de la solution surnageante, dans le tampon phosphate de LAUREL (422) (μ 0,07 ; pH 8,6). On considère que l'adsorption de l'ovoglycoprotéine est terminée lorsque la réaction d'EHRlich (b) (rose violacé sans fluorescence en U.V. avec l'ovoglycoprotéine ; jaune avec fluorescence en U.V. avec l'ovomucoïde) est négative. Le gel est alors séparé du surnageant par centrifugation et l'ovomucoïde adsorbé est désorbé par agitation pendant 20 mn avec une solution de phosphate de sodium 0,001 M de pH 5,5. L'ovoglycoprotéine est ensuite éluée avec une solution de phosphate 0,2 M de pH 6,8. On obtient de cette manière une première fraction K_1 qui, soumise à un nouveau "cycle" chromatographique, conduit à une seconde fraction K_2 plus pure.

Nous avons suivi, par électrophorèse sur acétate de cellulose, les modifications de composition de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER. Nous avons, en outre déterminé la composition centésimale en glucides des deux fractions d'ovoglycoprotéine et nous avons effectué l'immuno-électrophorèse de la dernière fraction.

B - RESULTATS.

L'application du procédé original de KETTERER nous a fourni 3,260 g de la fraction K_1 et 1,270 g de la fraction K_2 . Toutes deux sont encore très hétérogènes. Les analyses électrophorétiques sur acétate de cellulose (Fig. 27 ; p.102) révèlent en effet, la présence du lysozyme (bande 1), de l'ovoinhibiteur (bande 2), de l'ovomucoïde (bandes 3a et 3b) et d'un composant de vitesse de migration anodique plus élevée (bande 4).

(a)- Le gel d'hydroxylapatite a été préparé selon le mode opératoire décrit par TISELIUS, HJERTEN et LEVIN (423). Il est conservé à 2°C dans une solution de phosphate de sodium 0,001 M de pH 6,8.

(b)- Un volume d'une solution à 10 p.100 (p:v) de p-diméthylaminobenzaldéhyde dans l'acide chlorhydrique concentré + 4 volumes d'acétone. Les électrophorèses, fixées à 100° C pendant 30 mn sont imbibées du réactif par trempage et maintenues à 100° C pendant 30 mn.

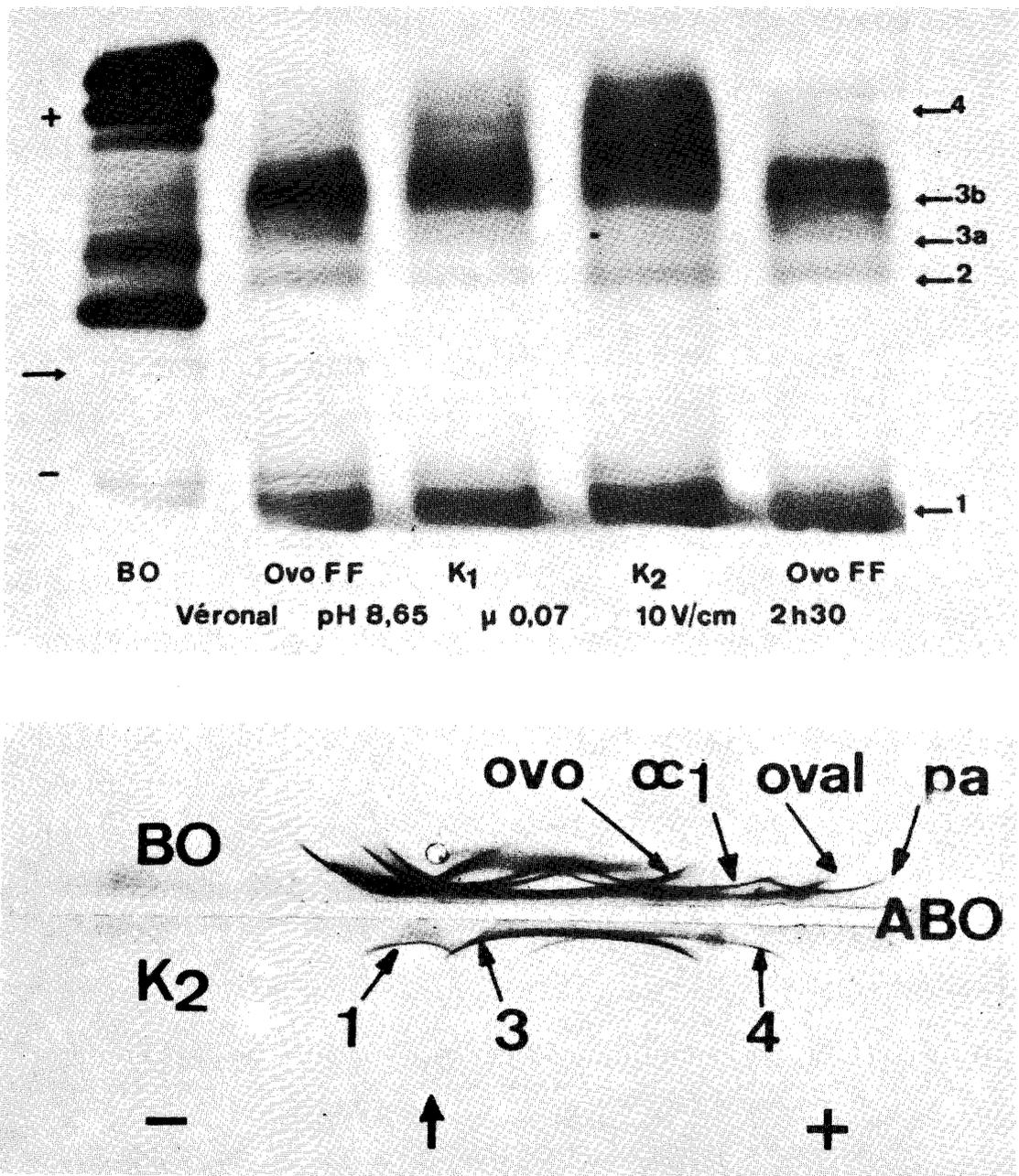


Figure 27

Electrophorèse sur acétate de cellulose du blanc d'oeuf (BO), de l'ovomucoïde selon FORSYTHE et FOSTER (ovo FF) et des fractions chromatographiques K₁ et K₂ obtenues par le procédé de KETTERER. Immuno-électrophorèse du blanc d'oeuf et de la fraction K₂. Les électrophorégrammes ont été révélés par une double coloration à l'Amidoschwarz et à la nigrosine. oval : ovalbumine ; ovo : ovomucoïde ; pa : préalbumine ; α₁ : globuline α₁ ; ABO : sérum anti-protéides du blanc d'oeuf.

Pour la signification des chiffres 1, 2, 3a, 3b et 4 voir le texte (p.101)

L'intégration des courbes d'enregistrement des électrophorèses sur acétate de cellulose (Fig. 28 ; p.104) indique que ce dernier représente 15 p.100 des protéides totaux de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER, 20 p.100 des protéides de la fraction K₁ et 32 p.100 de la fraction la plus pure K₂. On parvient donc par le procédé de KETTERER à obtenir une fraction enrichie en acide sialique (Tableau XV ; p.105) et en un composant de caractère anionique qui correspond à la bande électrophorétique 5 de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER.

Les analyses immuno-électrophorétiques ont été réalisées avec un immunsérum anti-protéides du blanc d'oeuf, qui avait été conservé pendant plus d'un an à -20° C. On voit sur la figure 27 (p.102) que l'arc de comportement α_1 est particulièrement net sur le diagramme obtenu avec le blanc d'oeuf lyophilisé et reconstitué en solution à 5 p.100. Au contraire l'arc du lysozyme est très faible et très court. C'est un tel arc que KAMINSKI et DURIEUX (424) ont identifié à l'arc du lysozyme. Dans ces conditions, la fraction K₂ placée dans le trou inférieur montre la ligne de l'ovomucoïde (ligne n° 3), une ligne de comportement α_1 (ligne n° 4) et la ligne du lysozyme (ligne n° 1). La ligne de l'ovoinhibiteur n'est pas visible.

C - CONCLUSIONS.

Le procédé de fractionnement sur hydroxylapatite conduit à des préparations enrichies en ovoglycoprotéine de KETTERER, et souillées de 24 p.100 de lysozyme, de 7 p.100 d'ovoinhibiteur et 36 p.100 d'"ovomucoïde". Pour tenter d'isoler l'ovoglycoprotéine pure, à partir des préparations ainsi obtenues, nous avons appliqué à la fraction K₂ la chromatographie sur colonne de CM-cellulose et de DEAE-cellulose.

II - MODIFICATIONS DE LA METHODE DE KETTERER.

A - CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE.

1° - PRINCIPE.

Nous avons appliqué la méthode chromatographique sur CM-cellulose décrite par RHODES, AZARI et FEENEY (425) pour le fractionnement du blanc d'oeuf. l'élution des protéides est obtenue avec un gradient discontinu de pH en tampon acétate d'ammonium.

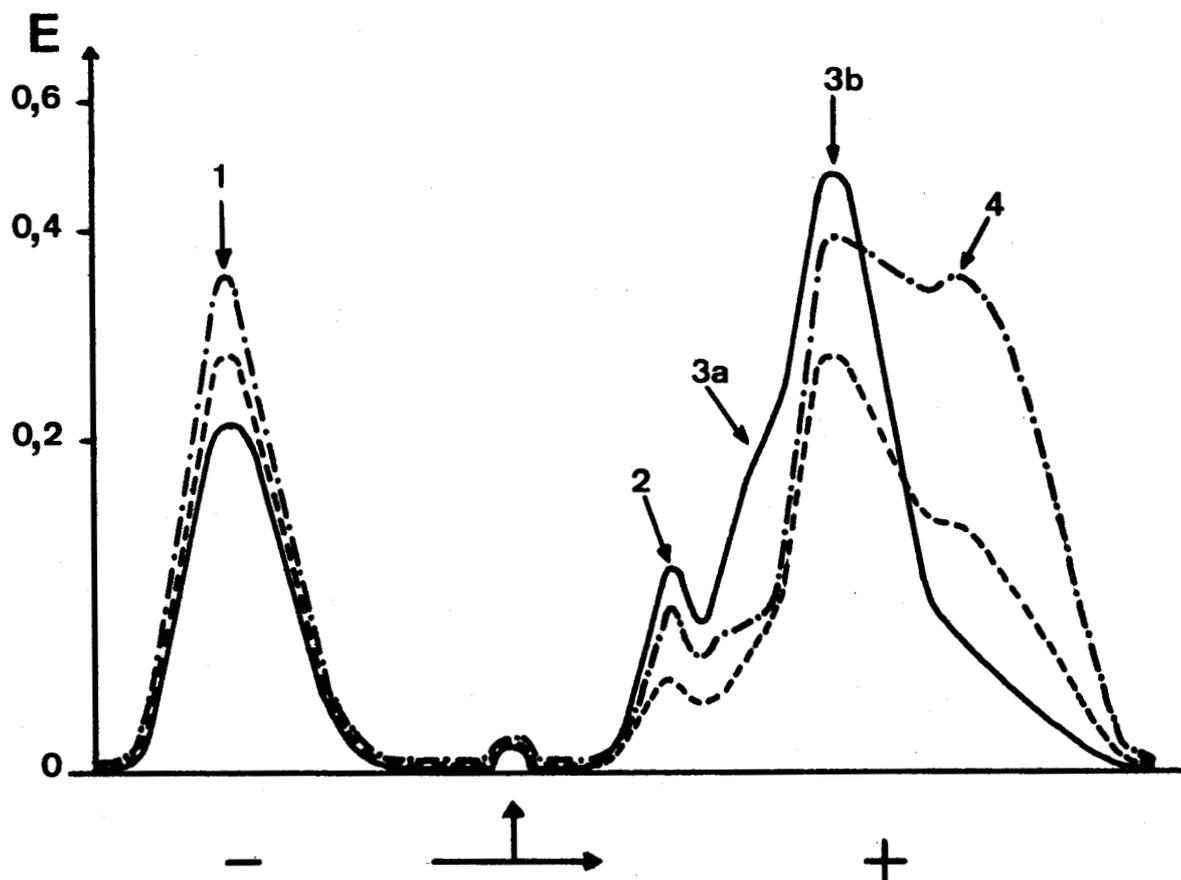


Figure 28

Enregistrement en lumière transmise des électrophorèses sur acétate de cellulose de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER (—) et des fractions chromatographiques K₁ (---) et K₂ (-·-·-).

Tampon véronal μ 0,07 pH 8,65

E : Densité optique.

Pour la signification des chiffres voir la figure précédente et le texte (page 101).

Tableau XV

Composition centésimale en glucides de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER des fractions chromatographiques K₁ et K₂ et de l'ovoglycoprotéine de KETTERER.

	Oses "neutres" p. 100	Osamines p.100	Acides sialiques p. 100	Oses Osamines	Oses Ac. sialiques
Ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER (426)	10,1	13,2	1,54	0,77	6,5
Fraction K ₁	10,05	12,39	2,13	0,81	4,71
Fraction K ₂	11,65	12,72	2,74	0,91	4,25
Ovoglycoprotéine de KETTERER (427)	13,6	13,8	3	1	4,5

2° - MODE OPERATOIRE.

500 mg des protéides provenant de la fraction K₂ (voir p.101) sont dissous dans 5 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M ajusté à pH 3,5 avec une solution concentrée d'ammoniaque et soumis à la chromatographie sur des colonnes (2 × 20 cm) de CM-cellulose stabilisée avec la solution tamponnée précédente. Le déplacement des constituants est effectué à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium (0,1 M en acide acétique) à 6 pH différents (ajustement avec une solution concentrée d'ammoniaque) : pH 3,5 - 3,7 - 3,9 - 4,1 - 4,3 - 4,7. Finalement un tampon acétate d'ammonium 0,1 M + NaCl 1 M pH 4,7 est passé sur la colonne dans le but d'éluer les protéides basiques fortement fixés sur la résine.

3° - RESULTATS.

La figure 29 (p.107) illustre le résultat du fractionnement chromatographique sur CM-cellulose de la fraction K₂. Cinq fractions ont été obtenues avec, dans le cas particulier de cette expérience, les rendements suivants (pour 500 mg de fraction K₂) :

Pic A	:	11 mg
Pic B	:	92 mg
Pic C	:	147 mg
Pic D ₁	:	38 mg
Pic D ₂	:	20 mg

Etant donné le caractère anionique très marqué de l'ovoglycoprotéine et son point isoélectrique approximatif voisin de 3,9 (KETTERER)(428) il était logique de penser qu'elle ne serait pas retenue par la cellulose échangeuse de cations. Or, aucun pic n'a pu être caractérisé à différentes valeurs de pH comprises entre 3,5 et 4,1. Le pic A élué à ce dernier pH est hétérogène : il ne représente que 3,5 p.100 des protéides récupérés (a) et, comme le pic B, contient de l'ovomucoïde et un peu d'ovoglycoprotéine. (Fig. 30 ; p.108).

Les pics D₁ et D₂ renferment les composants précédents et sont, en outre, enrichis respectivement en ovoinhibiteur et en lysozyme.

Le pic C, pondéralement le plus important (47 p.100 des protéides récupérés) présente une hétérogénéité moindre. Il renferme un composant majeur dont le comportement électrophorétique est comparable à celui de l'ovoglycoprotéine. En immuno-électrophorèse (Fig. 30 ; p.108) il montre une ligne correspondant à l'ovomucoïde et un arc de comportement α_1 .

(a) La fraction K₂ contient 32 p.100 d'ovoglycoprotéine.

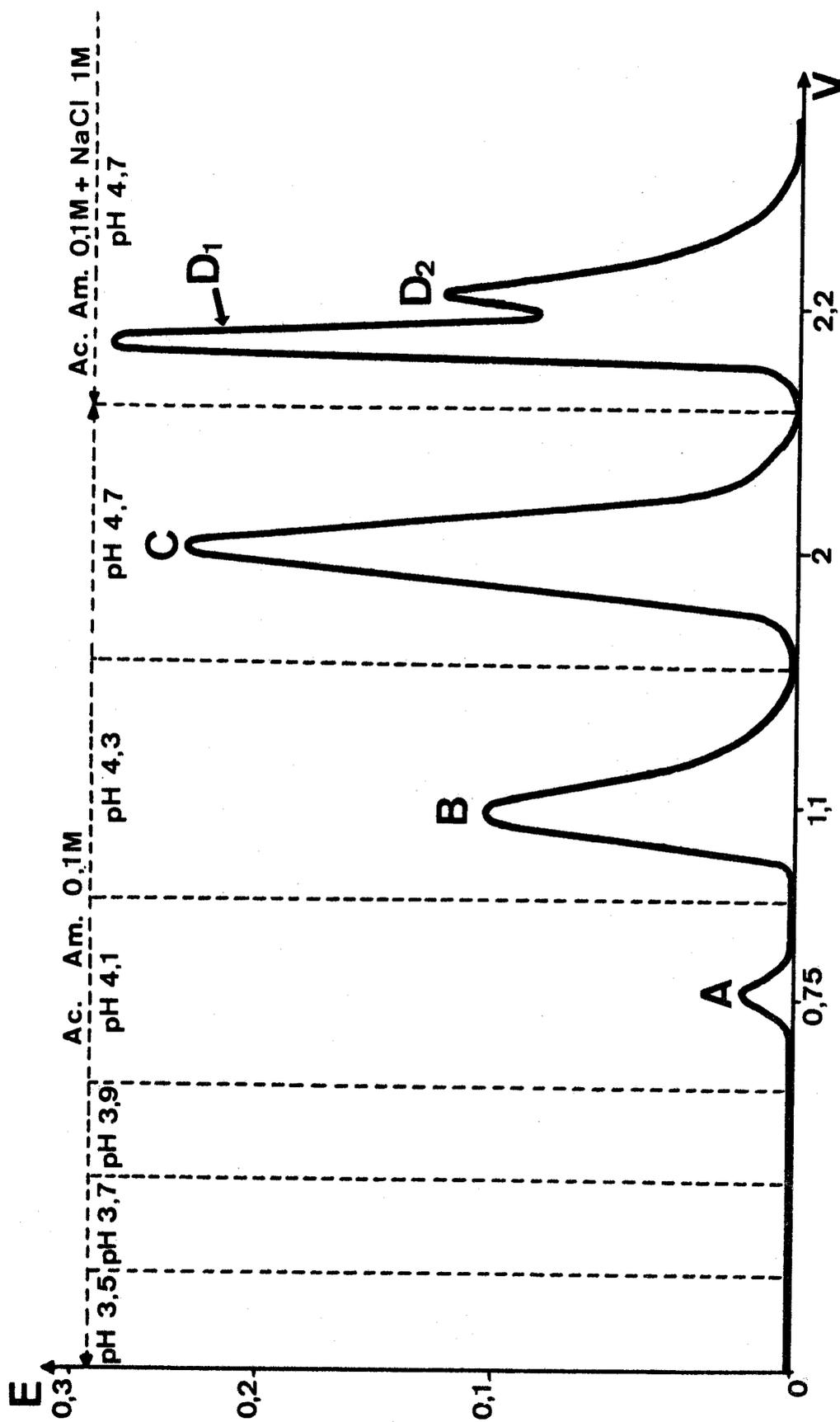


Figure 29

Chromatographie sur C M cellulose de la fraction K2 obtenue par le procédé de KEFFERER (voir p.103).

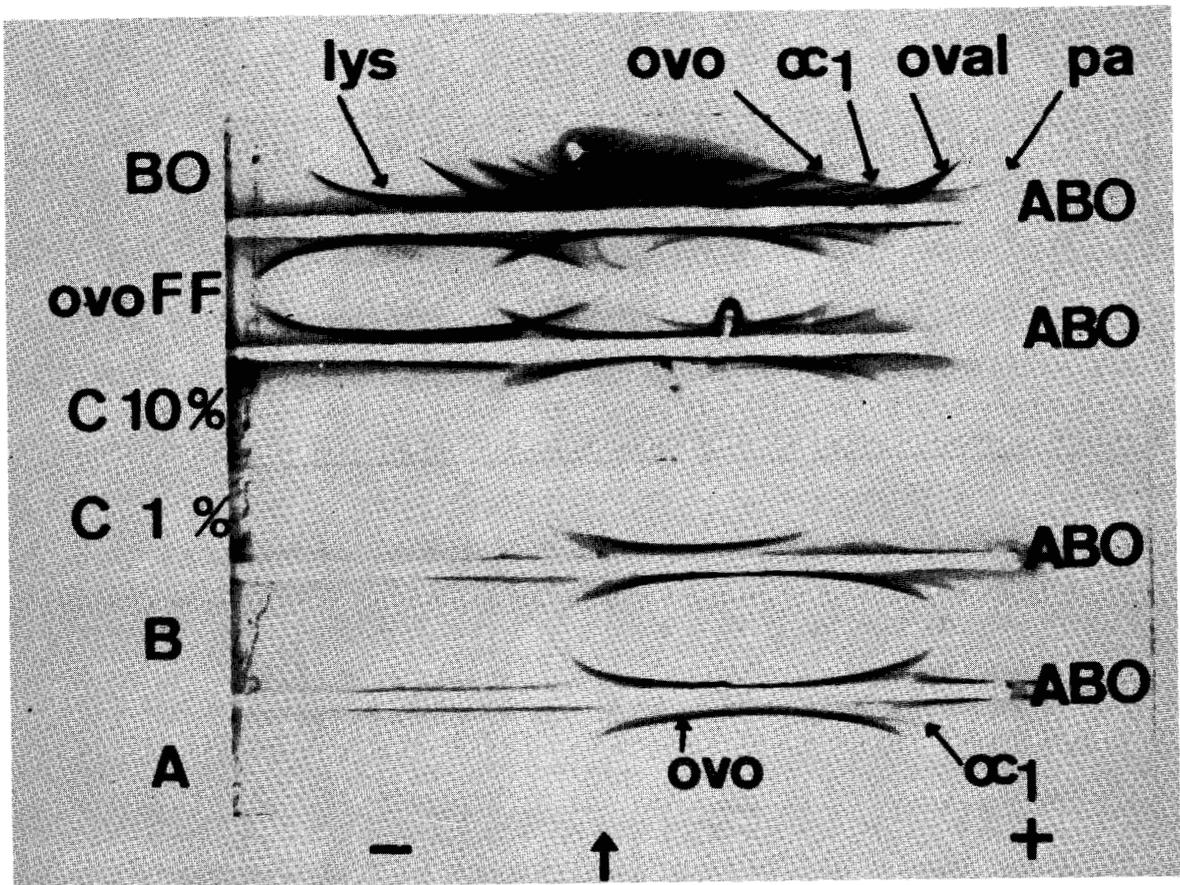
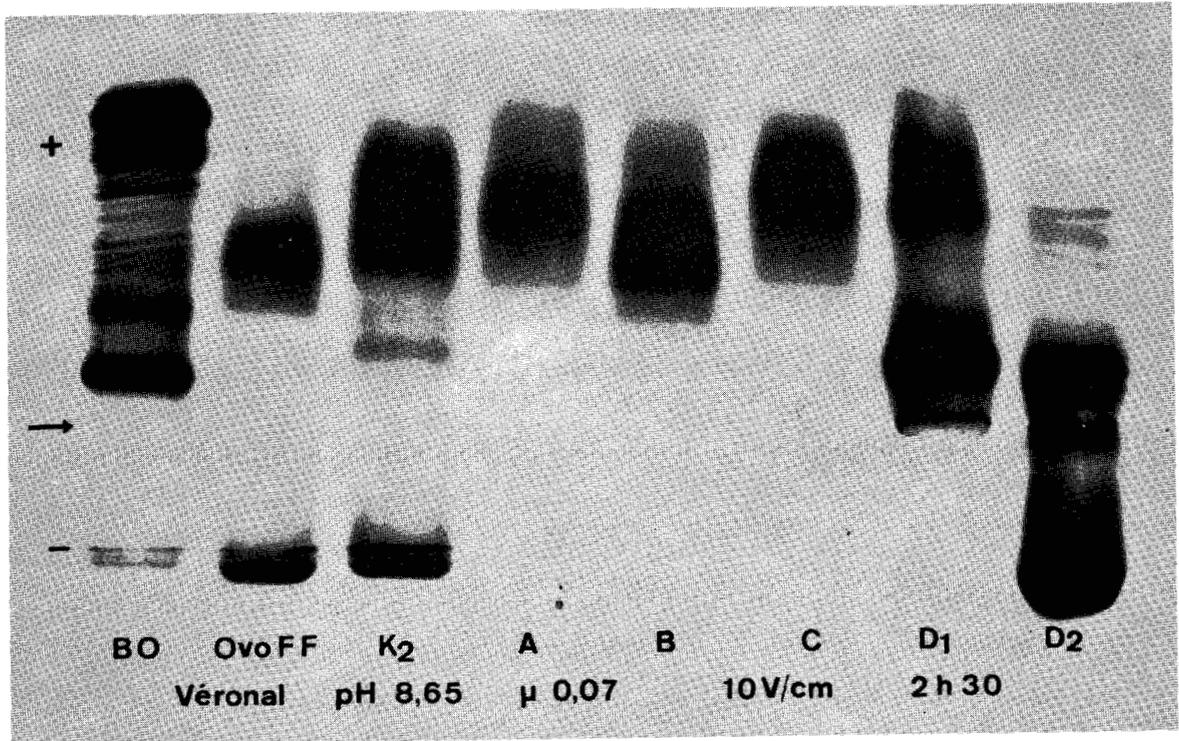


Figure 30

Electrophorèse sur acétate de cellulose des fractions d'éluéon correspondant au diagramme chromatographique de la figure 29 (p.107) et immuno-électrophorèses des fractions A, B et C.

BO : blanc d'oeuf ; ovo FF : ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER ; lys : lysozyme ; oval : ovalbumine ; ovo : ovomucoïde ; pa : préalbumine ; α₁ : globuline α₁ ; ABO : sérum anti-protéides du blanc d'oeuf.

Sa composition centésimale en glucides est la suivante :

Oses "neutres"	:	10,23 p.100
Osanine	:	13,39 p.100
Acide sialique	:	3,66 p.100
Oses "neutres"		
-----	:	0,76
Osanine		
Oses "neutres"		
-----	:	2,79
Acide sialique		

4° - CONCLUSIONS.

La chromatographie de la fraction K₂ sur CM-cellulose avec un gradient discontinu de pH en tampon acétate d'ammonium fournit une préparation plus riche en acide sialique que le composé isolé par KETTERER, débarrassé du lysozyme et de l'ovoinhibiteur, mais encore hétérogène à l'immuno-électrophorèse.

Devant l'insuccès de ce procédé nous nous sommes tourné vers l'emploi de la DEAE-cellulose.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE.

1° - PRINCIPE.

Une série d'essais nous ont montré que la DEAE-cellulose, stabilisée dans des tampons de pH 6,7 et 8, fixait énergiquement les composants électro-négatifs de la fraction K₂ et fournissait ensuite des pics d'élu-tion très mal individualisés, présentant de longues traînées. Afin d'atténuer le caractère électropositif de la résine, nous avons employé un tampon phosphate de pH 4,7. L'élu-tion des protéides a été réalisée avec un gradient discontinu de concentration en NaCl.

2° - MODE OPERATOIRE.

8,5 ml d'une solution de 850 mg des protéides de la fraction K₂, dans le phosphate de sodium 0,005 M de pH 4,7 sont déposés au sommet de colonnes (2 x 30 cm) de DEAE-cellulose équilibrée avec le tampon précédent. Le déplacement des constituants est effectué par le passage d'un tampon phosphate 0,005 M de pH 4,7 et dont la concentration en NaCl a été ensuite portée successivement à 0,05 M - 0,1 M et 0,2 M.

3° - RESULTATS.

La chromatographie de la fraction K₂ sur DEAE-cellulose (Fig. 31 ; p.111) fournit 4 fractions :

Pic A	:	113 mg
Pic B	:	51 mg
Pic C	:	--
Pic D	:	498 mg

L'analyse électrophorétique montre que la fraction A est constituée essentiellement par l'ovoinhibiteur et le lysozyme. La fraction B contient les protéides précédents, de l'ovomucoïde et des composants à caractère anionique. Enfin, la fraction D renferme principalement l'ovoglycoprotéine souillée d'ovomucoïde.

L'immuno-électrophorèse appliquée à la fraction D confirme son hétérogénéité : deux lignes de précipitation de comportement β_1 et α_1 sont en effet nettement visibles (Fig. 31 ; p.111). Néanmoins, la fraction D est homogène en ultracentrifugation (Fig. 32 ; p.112). Sa constante de sédimentation égale à 2,16 est plus faible que la valeur déterminée par KETTERER ($S_{20w}^0 = 2,47$) (429).

Sa composition centésimale en glucides est la suivante :

Oses "neutres"	:	11,01 p.100
Osamine	:	13,23 p.100
Acide sialique	:	3,80 p.100
Oses		
-----	:	0,83
Osamine		
Oses		
-----	:	2,89
Acide sialique		

4° - CONCLUSIONS.

La chromatographie de la fraction K₂ sur DEAE-cellulose avec un gradient discontinu de concentration en NaCl dans un tampon phosphate 0,005M de pH 4,7 permet d'éliminer le lysozyme et l'ovoinhibiteur. La fraction D, éluée avec le tampon 0,2 M en NaCl, est enrichie en acide sialique, mais demeure hétérogène en électrophorèse et en immuno-électrophorèse qui montrent la présence d'ovoglycoprotéine souillée d'ovomucoïde.

La discordance entre ce dernier résultat et celui de l'ultracentrifugation n'est qu'apparente. En effet, l'ovomucoïde et l'ovoglycoprotéine possèdent des masses moléculaires très voisines et respectivement égales à

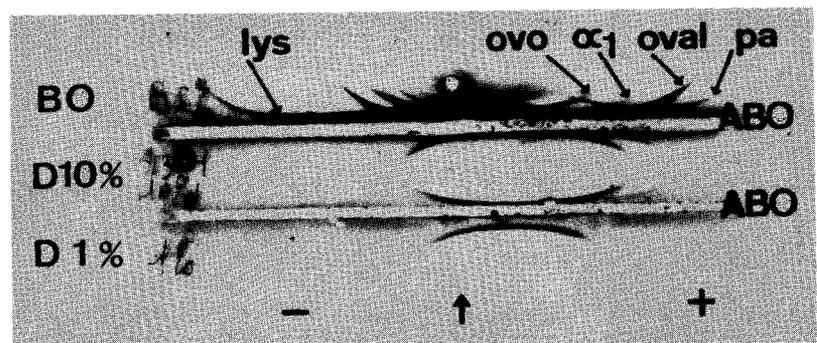
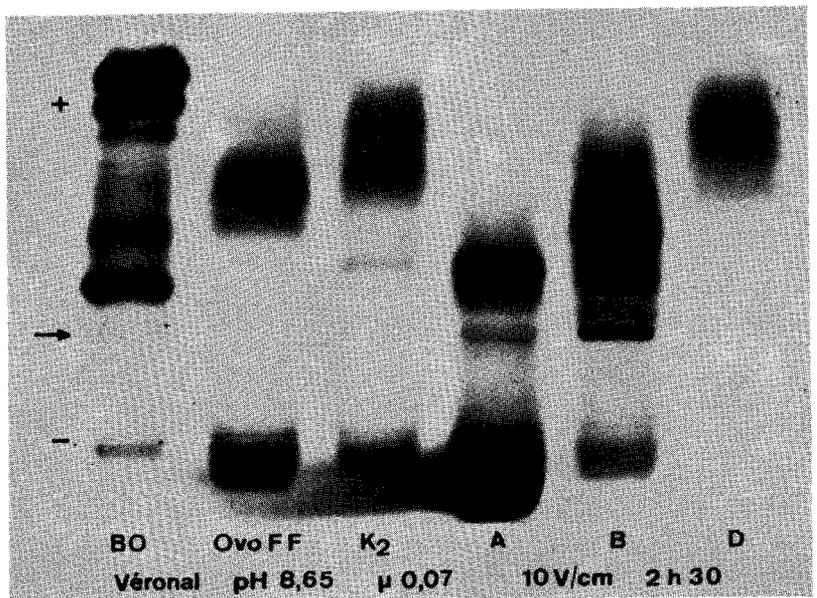
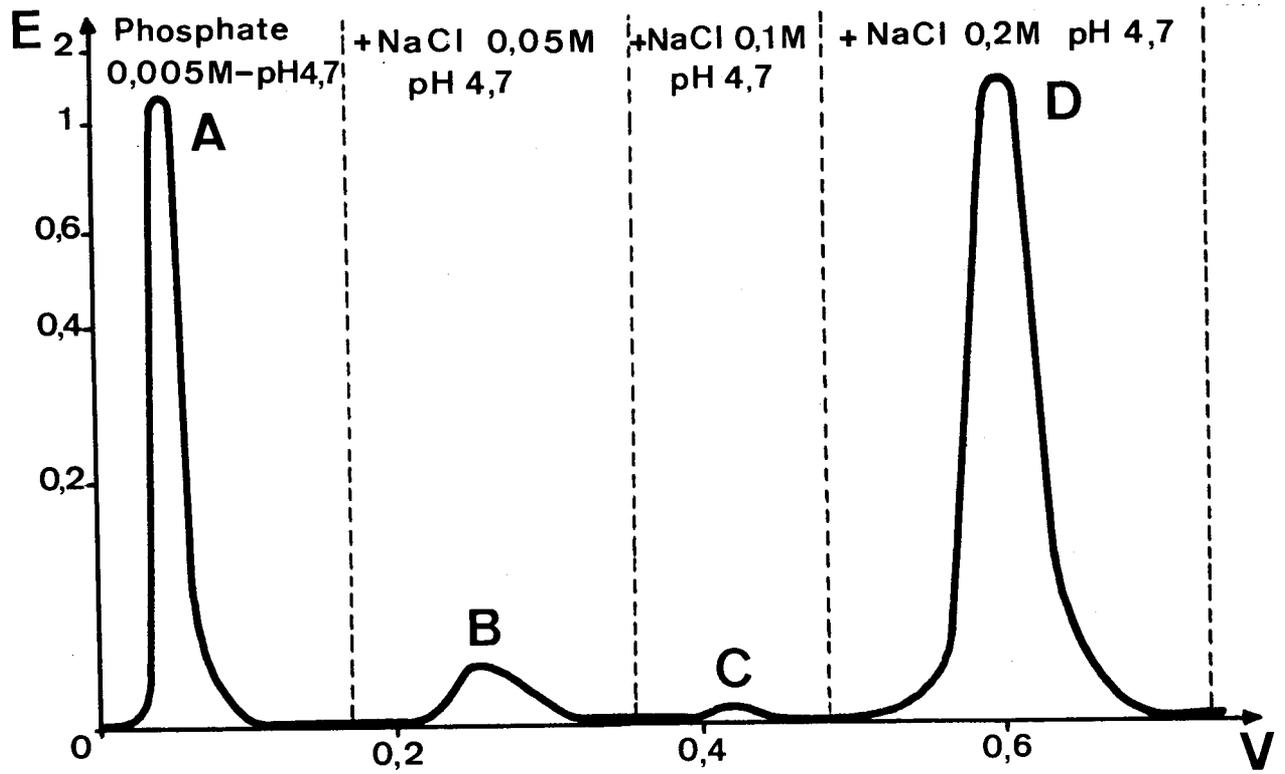


Figure 31

Diagramme d'éluion sur DEAE-cellulose des protéides de la fraction K₂ préparée par le procédé de KETTERER. Electrophorèse sur acétate de cellulose des fractions obtenues et immuno-électrophorèse de la fraction D.

Pour la signification des abbréviations, voir la légende de la figure 30 (p.108).

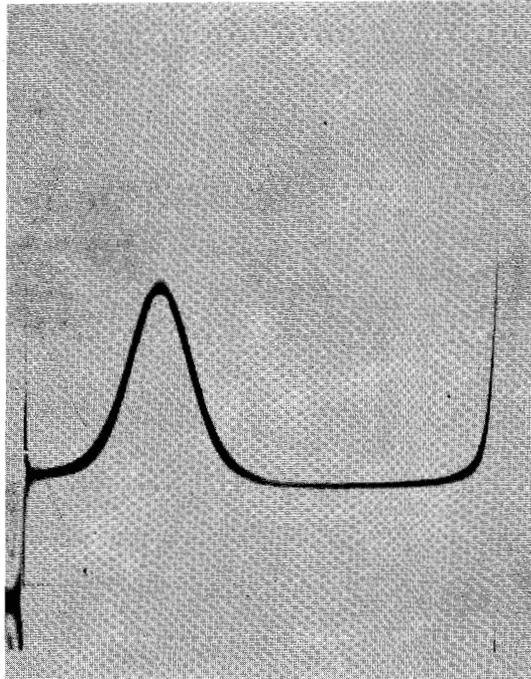


Figure 32

Diagramme d'ultracentrifugation de la fraction D du schéma de la figure 31 (p.111). Tampon phosphate + NaCl de μ 0,1 et de pH 7 ; température : 20° C ; inclinaison de la barre 60° ; concentration 12 mg / ml ; cliché photographique pris après 114 mn de centrifugation.

24 000 (MONTREUIL et coll.) (430) et 24 400 (KETTERER) (431). L'homogénéité en ultracentrifugation ne constitue donc pas un critère suffisant pour juger de la pureté des préparations d'ovoglycoprotéine et d'ovomucoïde.

Enfin, la faible valeur de la constante de sédimentation indique probablement une dénaturation partielle de la préparation.

C - CONCLUSIONS CONCERNANT LES MODIFICATIONS DE LA METHODE DE KETTERER.

Les chromatographies sur CM-cellulose et DEAE-cellulose de la fraction K_2 obtenue par chromatographie de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER sur gel d'apatite, ne nous ont pas conduit à l'isolement d'un composé pur. Elles fournissent toutefois des préparations débarrassées de lysozyme et d'ovoinhibiteur, enrichies en acide sialique et contenant un composant majeur dont la vitesse de migration électrophorétique est analogue à celle de l'ovoglycoprotéine. Ces résultats associés à ceux de l'analyse immuno-électrophorétique nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'arc de comportement α_1 correspond à l'ovoglycoprotéine.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de mettre au point un procédé qui fournisse une préparation immuno-électrophorétiquement pure de cette glycoprotéine.

III - PROCEDE PERSONNEL.

A - PRINCIPE

L'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER est fractionné par chromatographie sur DEAE-cellulose. L'élution des protéides est obtenue avec un gradient discontinu de concentration en NaCl dans un tampon phosphate de sodium de pH 8. La fraction éluee par le tampon de force ionique la plus élevée est "recyclée" sur une DEAE-cellulose dans les mêmes conditions.

B - MODE OPERATOIRE.

1° - CHROMATOGRAPHIE DE L'OVOMUCOÏDE DE FORSYTHE ET FOSTER SUR DEAE-CELLULOSE.

3 g d'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER sont dissous dans 30 ml de tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 8. La solution est soumise à la chromatographie sur des colonnes (2 x 45 cm) de DEAE-cellulose "équilibrée" avec le tampon précédent. Le déplacement des constituants est effectué par le passage successif des tampons suivants :

- Phosphate de sodium 0,005 M de pH 8
- Phosphate de sodium 0,005 M + NaCl 0,03 M de pH 8
- Phosphate de sodium 0,005 M + NaCl 0,1 M de pH 8
- Phosphate de sodium 0,005 M + NaCl 0,2 M de pH 8

Le pic D élué avec le dernier tampon constitue la "fraction ovoglycoprotéine".

2° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA "FRACTION OVOGLYCOPROTEINE".

1,400 g des protéides de la "fraction ovoglycoprotéine" correspondant au pic D de huit chromatographies d'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER, sont rechromatographiés sur DEAE-cellulose selon le protocole expérimental que nous avons décrit ci-dessus.

C - RESULTATS.

1° - CHROMATOGRAPHIE DE L'OVOMUCOÏDE DE FORSYTHE et FOSTER SUR DEAE-CELLULOSE.

a - La figure 33 (p.115) illustre le résultat du fractionnement chromatographique sur DEAE-cellulose, de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER. Nous avons "découpé" le chromatogramme en huit fractions qui nous ont fourni les quantités de protéides suivants :

Pic A	:	356 mg
Pic B ₁	:	679 mg
Pic B ₂	:	258 mg
Pic B ₃	:	36 mg
Pic C ₁	:	914 mg
Pic C ₂	:	30 mg
Pic C ₃	:	70 mg
Pic D	:	180 mg

Les électrophorèses sur acétate de cellulose de ces diverses fractions et les immuno-électrophorèses effectuées sur les fractions B₁, C₁, C₂, et D sont illustrées par la figure 34 (p.116). La composition centésimale en glucides est rapportée dans le tableau XVI (p.117).

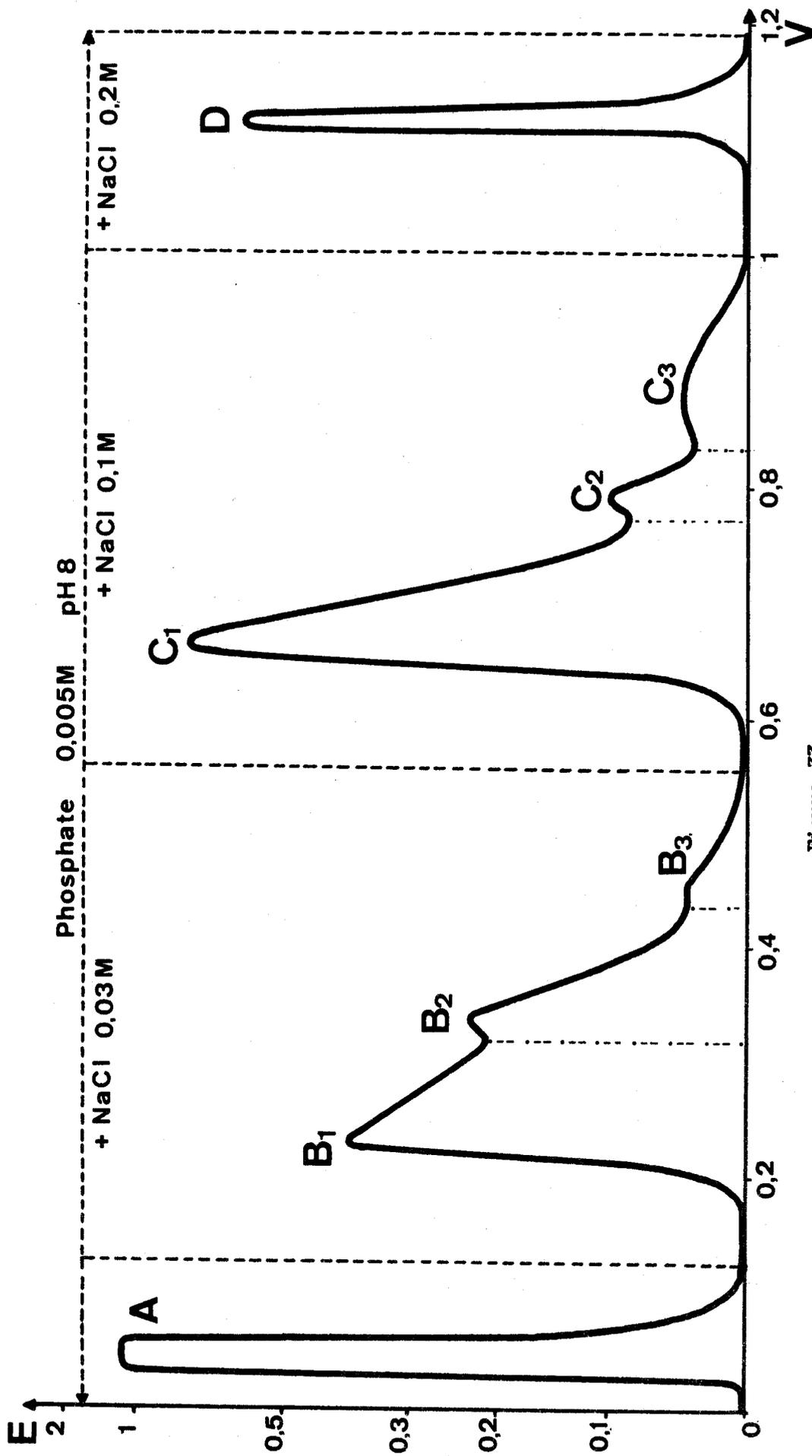


Figure 33

Chromatographie de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER sur D E A E cellulose

En tampon phosphate 0,005 M de pH8 ; gradient discontinu en NaCl.

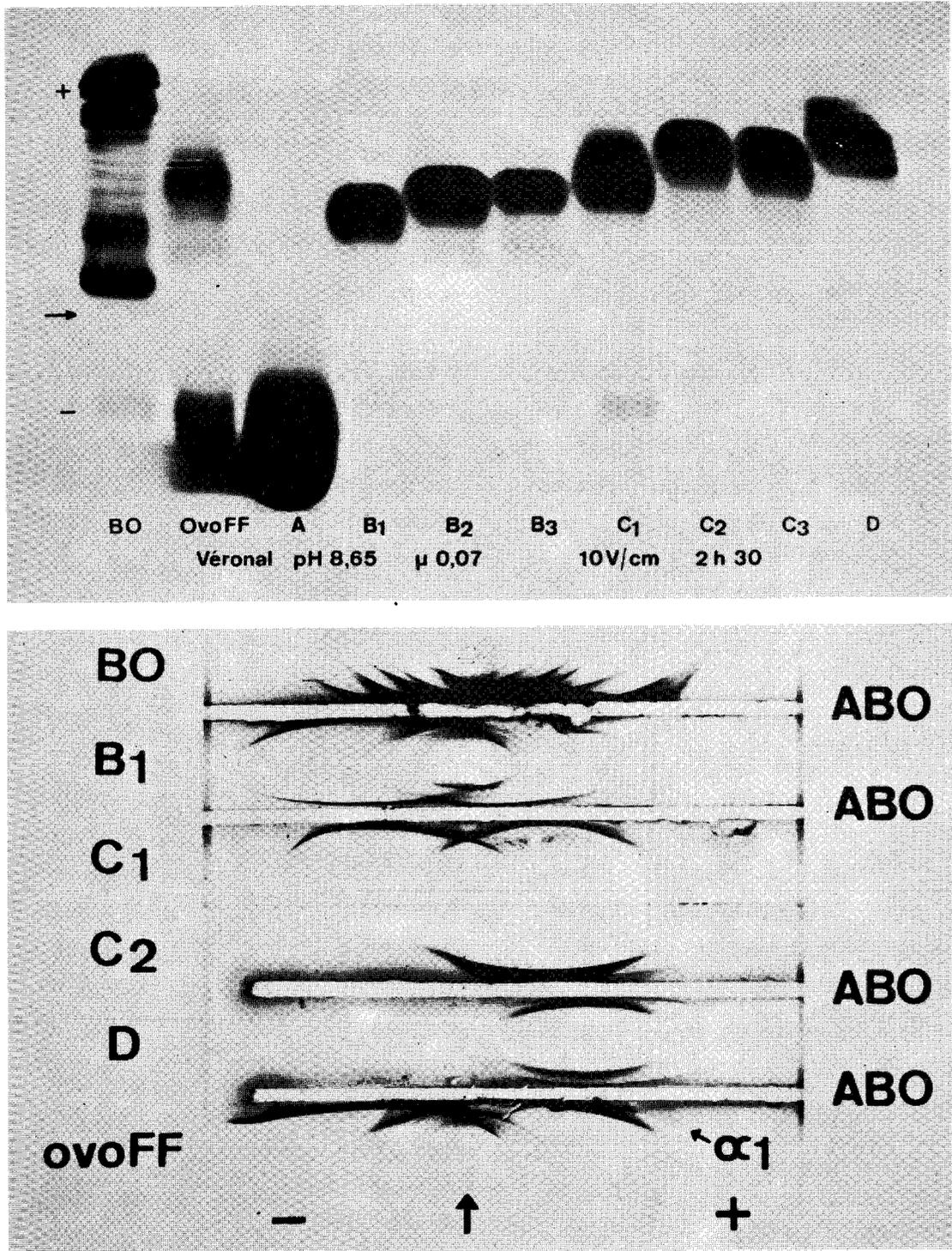


Figure 34

Electrophorèse sur acétate de cellulose et immuno-électrophorèses des fractions correspondant au chromatogramme de la figure 33 (p.115).

Les électrophorégrammes ont été révélés par une coloration double à l'Amidoschwarz et à la nigrosine.

BO : blanc d'oeuf ; ovo FF : ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER ;
α₁ : globuline α₁ ; ABO : sérum anti-protéine du blanc d'oeuf.

Tableau XVI
Composition centésimale en glucides des fractions obtenues par chromatographie de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER sur DEAE-cellulose.

Désignation des fractions (a.)	Oses "neutres" p. 100	Osamines p. 100	Acides sialiques p. 100	Oses ----- Osamines	Oses ----- Ac. sialiques
B 1	8,60	15,48	0,93	0,55	9,24
B 2	8	13,52	0,99	0,59	8,08
C 1	8,20	11,45	1,21	0,71	6,77
C 2	9,20	11,05	2,49	0,83	3,69
C 3	9,38	11,00	3,05	0,85	3,07
D	11,02	12,75	4,11	0,86	2,68

(a.) voir les figures 33 (p.115) et 34 (p.116).

b - La fraction A est constituée exclusivement de lysozyme.

c - Les fractions B₁, B₂ et B₃ renferment, outre des traces de lysozyme et la totalité de l'ovoinhibiteur présent dans la préparation d'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER, un composant majeur qui correspond aux bandes les moins anioniques de l'ovomucoïde.

Leur composition centésimale en glucides est voisine de celle des différentes préparations d'ovomucoïde (voir tableau VI ; p. 36) et leur teneur en acide sialique en particulier est faible, moins de 1 p.100.

L'immuno-électrophorèse réalisée sur la fraction B₁ montre la présence des lignes de précipitation du lysozyme, de l'ovoinhibiteur et de l'ovomucoïde. L'arc de la globuline α_1 présent sur le diagramme du blanc d'oeuf et de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER est absent de cette fraction.

d - Les fractions C₁, C₂ et C₃ possèdent des caractères plus anioniques que les fractions précédentes. Toutefois, la fraction C₁ correspond à la bande électrophorétique majeure de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER, tandis que les fractions C₂ et C₃ sensiblement identiques sont plus rapides.

L'analyse immuno-électrophorétique et la composition centésimale en glucides confirment la différence de comportement électrophorétique entre la fraction C₁, d'une part, et les fractions C₂ et C₃, d'autre part. En effet, la fraction C₁ comme le pic B₁ ne montre pas l'arc de comportement α_1 et sa teneur en acide sialique, quoique légèrement supérieure à celles des fractions du groupe B, demeure comparable à celles de nombreuses préparations d'ovomucoïde. Au contraire, les fractions C₂ et C₃ sont riches en acide sialique et l'immuno-électrophorèse appliquée à la fraction C₂ montre la présence de l'ovomucoïde et d'un composant de comportement α_1 .

e - La fraction D est constituée par un composant majeur de vitesse de migration anodique élevée qui correspond à la bande électrophorétique 4 de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER. Très riche en acide sialique cette fraction présente deux arcs en immuno-électrophorèse : l'arc de la globuline α_1 à l'intérieur duquel se trouve un arc plus court qui, par sa position, correspond à l'extrémité de la ligne d'ovomucoïde.

2° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION "OVOGLYCOPROTEINE".

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure 35 (p.119).

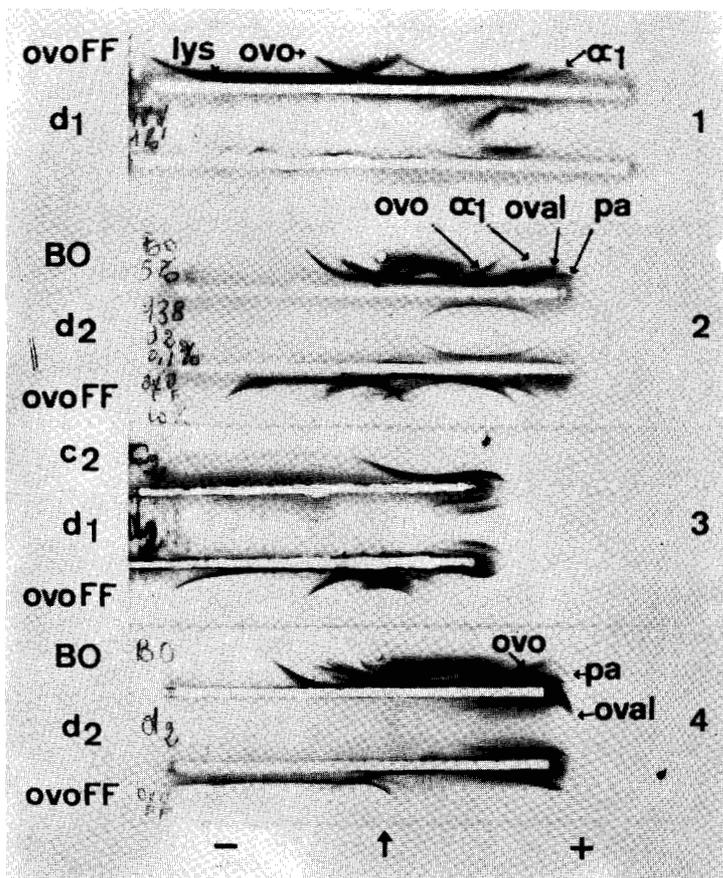
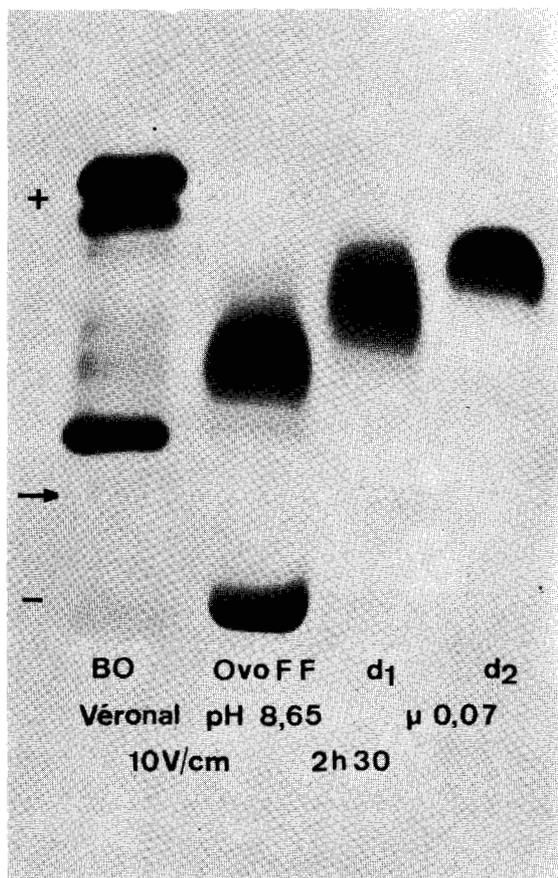
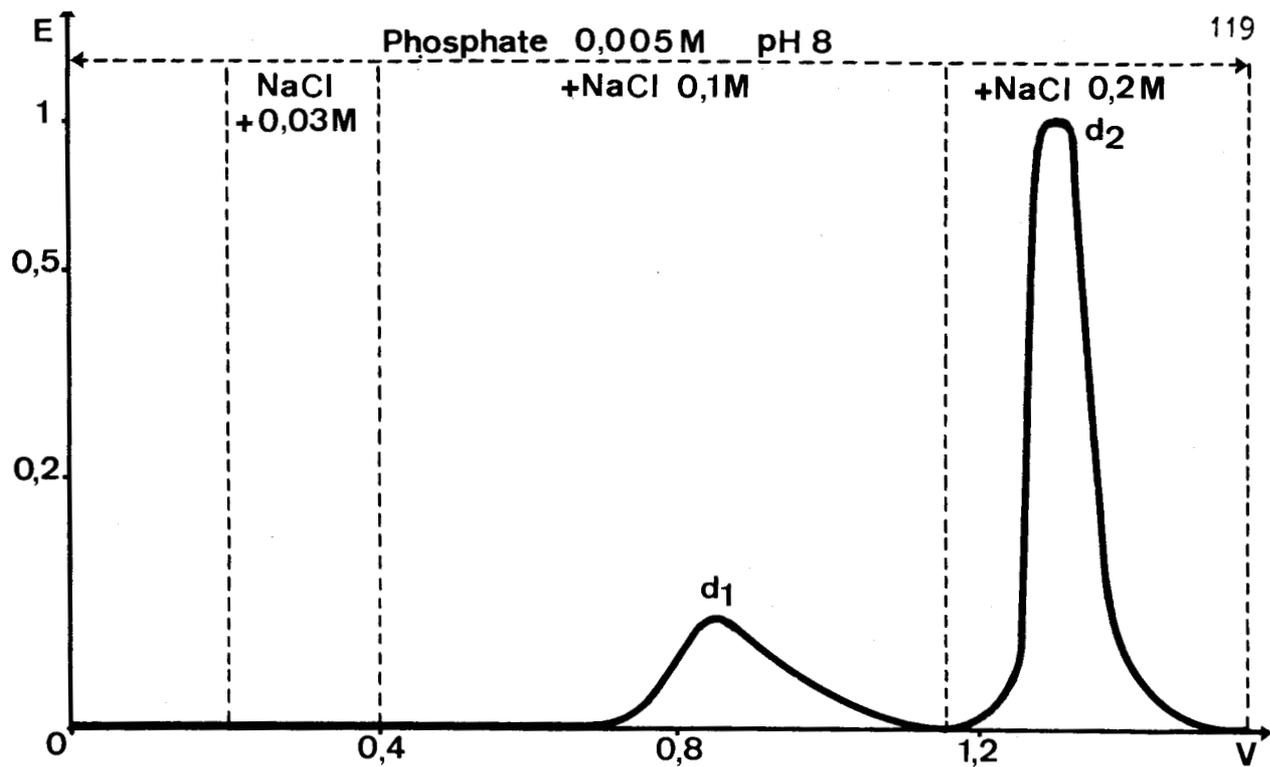


Figure 35

Re-chromatographie sur DEAE-cellulose des protéides du pic D du diagramme de la page 115 ; électrophorèse sur acétate de cellulose et immuno-électrophorèse des fractions obtenues. BO : blanc d'oeuf ; ovo FF : ovomucoïde selon FORSYTHE et FOSTER ; lys : lysozyme ; oval : ovalbumine ; ovo : ovomucoïde ; pa : préalbumine ; α₁ : globuline α₁ ; C₂ : voir la figure 34 (p. 111)

Le sous-fractionnement du pic D conduit à deux sous-fractions d_1 et d_2 qui nous ont fourni respectivement 0,440 g et 0,780 g de protéides pour 1,400 g de "fraction ovoglycoprotéine".

Les deux fractions possèdent des vitesses de migration électrophorétique anodiques ; la fraction d_1 toutefois donne une bande étalée et moins homogène que la fraction d_2 .

L'immuno-électrophorèse révèle l'hétérogénéité de la fraction d_1 . Sur la plaque 1 de la figure 35 (p.119), on voit, en effet, l'arc de comportement α_1 et un arc fragmentaire, intérieur. La plaque 2 confirme au contraire l'homogénéité de la fraction d_2 qui ne donne qu'une seule ligne de précipitation de comportement α_1 .

Dans le but d'identifier précisément ces deux arcs, nous avons appliqué l'immuno-électrophorèse aux deux fractions sur des plaques dont les canaux contenant l'immunsérum anti-protéides du blanc d'oeuf ont été raccourcis du côté de l'anode. Sur la plaque 3 de la figure 35 (p.119) le trou supérieur a reçu la fraction C_2 du schéma de la figure 34 (p.116) et le trou inférieur une préparation d'ovomucoïde selon FORSYTHE et FOSTER ; la fraction d_1 a été placée dans le trou central. L'arc diffus situé à l'intérieur de l'arc de comportement α_1 , se raccorde exactement à la ligne de l'ovomucoïde des diagrammes supérieur et inférieur. Sur la plaque 4, la fraction d_2 a été comparée au blanc d'oeuf total (réservoir supérieur) et à l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER (réservoir inférieur). L'arc de comportement α_1 croise l'arc de l'ovalbumine du diagramme supérieur ce qui est la conséquence d'une réaction de non-identité totale entre les deux protéides, mais rejoint parfaitement les lignes de vitesse α_1 présentes sur les diagrammes du blanc d'oeuf et de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER.

La fraction d_2 est homogène en ultracentrifugation (Fig. 36 ; p.121).

La composition centésimale en oses et en osamine ainsi que le rapport oses / osamine (Tableau XVII ; p.122) rapprochent la fraction d_1 de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER mais apparente la fraction d_2 aux préparations d'ovoglycoprotéine de KETTERER. Toutefois les teneurs en acide sialique sont très élevées ; la fraction d_2 en particulier en contient deux fois plus que la fraction K_2 obtenue par le procédé de KETTERER.

D - CONCLUSIONS.

Le fractionnement chromatographique de l'ovomucoïde sur DEAE-cellulose en tampon phosphate de pH 8 et en gradient discontinu de concentration en NaCl, nous a permis d'obtenir une entité immunologiquement

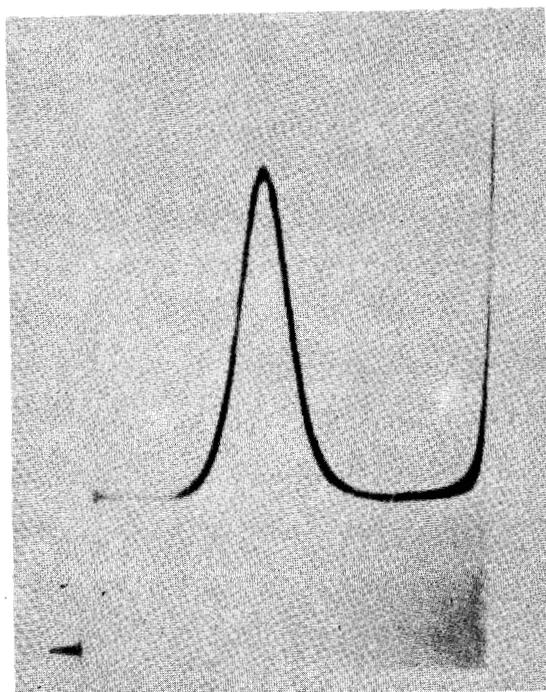


Figure 36

Diagramme d'ultracentrifugation de la fraction d_2 . (Fig. 35 ; p.119).
Tampon phosphate de μ 0,1 et de pH 7 ; température : 20° C ; inclinaison de
la barre 60° ; concentration : 15 mg / ml ; cliché photographique pris après
112 mn de centrifugation.

Tableau XVII

Composition centésimale en glucides de l'ovoglycoprotéine de KETTERER et des fractions d₁ et d₂ obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose du pic D de la figure 33 (p.115).

Désignation des fractions *	Oses "neutres" p. 100	Osamine p. 100	Acide sialique p. 100	Oses ----- Osamine	Oses ----- Ac. sialique
	Ovoglycoprotéine de KETTERER(432)	13,6	13,8	3	1
d ₁	9,7	12,7	4	0,77	2,45
d ₂	13	13,90	5,90	0,93	2,20

(*) voir la figure 35 (p.119).

définie et que nous avons identifiée au composant de vitesse α_1 du blanc d'oeuf et de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER.

Le constituant que nous avons isolé se distingue de l'ovoglycoprotéine par sa teneur deux fois plus élevée en acide sialique. Nous ne pouvons à cet égard comparer nos résultats avec ceux de KETTERER, ce dernier n'ayant effectué aucun contrôle immuno-électrophorétique de ses préparations.

Les résultats que nous avons obtenus montrent en outre que la chromatographie sur DEAE-cellulose avec des solutions tamponnées à pH 8 a permis de résoudre le problème de l'isolement de l'ovoglycoprotéine lorsque nous avons soumis au fractionnement l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER, alors qu'elle a échoué quand nous avons appliqué le même procédé aux préparations obtenues par la méthode de KETTERER. L'efficacité du fractionnement chromatographique sur DEAE-cellulose dépend donc pour une bonne part de la composition en protéides des solutions étudiées.

IV - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA PREPARATION DE L'OVOGLYCOPROTEINE.

L'application du procédé de KETTERER ne nous a pas fourni des préparations pures d'ovoglycoprotéine. Toutes les tentatives de purification de ces dernières par chromatographie sur CM-cellulose et DEAE-cellulose ont échoué. Certes, les fractions que nous avons ainsi obtenues sont débarrassées du lysozyme et de l'ovoinhibiteur mais aucune, soumise à l'analyse immuno-électrophorétique, ne s'est révélée exempte d'ovomucoïde.

Le fractionnement direct de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER sur DEAE-cellulose nous a conduit à l'isolement d'un protéide pur dont la ligne de précipitation en immuno-électrophorèse est celle de la globuline α_1 observée par MONTREUIL et coll. (433) dans les préparations d'ovomucoïde.

La discordance entre nos résultats et ceux de KETTERER concernant en particulier la teneur en acide sialique, nous a incité à préciser les propriétés physico-chimiques du constituant que nous avons isolé.

2 - PROPRIETES PHYSIQUES.

I - MASSE MOLECULAIRE.

La masse moléculaire a été calculée sur la base des données de l'ultracentrifugation. Les déterminations ont été effectuées à l'approche de l'équilibre de sédimentation et par la méthode de SVEDBERG.

A - METHODES.

1° - DETERMINATION A L'APPROCHE DE L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION.

La détermination de la masse moléculaire de l'ovoglycoprotéine à l'équilibre de sédimentation a été effectuée sur une solution à 7 mg p. ml de tampon phosphate 0,1 M - NaCl 0,1 M de pH 7, à 20°C, à 13 410 t/mn, 21 740 t/mn, 33 450 t/mn et 47 660 t/mn.

2° - DETERMINATION PAR LA METHODE DE SVEDBERG.

-a- Détermination des constantes de sédimentation et de diffusion libre.

Les constantes de sédimentation et de diffusion ont été déterminées en extrapolant à une dilution infinie dans l'eau, la droite obtenue avec les valeurs données par des solutions à 5,7 , 10 et 15 mg d'ovoglycoprotéine par ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7.

-b- Détermination du volume spécifique partiel.

Le volume spécifique partiel a été mesuré par pycnométrie, d'une part, et calculé d'après la composition de l'ovoglycoprotéine, d'autre part. Dans le deuxième cas, nous nous sommes fondé sur les valeurs des volumes spécifiques partiels des acides aminés données par COHN et EDSALL (434) et sur celles des oses précisées par SQUIRE et coll. (435) et par BEZKOROVAINY et coll. (436).

B - RESULTATS.

La constante de sédimentation décroît quand la concentration en protéide augmente de 5 à 15 p.100, n'indiquant ainsi aucun équilibre entre des phénomènes d'association ou de dissociation. La constante de sédimentation S_{20W}^0 est égale à 2,70 et la constante de diffusion D_{20W}^0 à 7,51. Le volume spécifique partiel calculé avec les données des mesures de densité

est égal à 0,676 g / ml et à 0,680 g / ml d'après la composition en acides aminés et en oses.

En introduisant la valeur de ces divers paramètres dans la formule de SVEDBERG, nous avons calculé une masse moléculaire de 27 600 ou de 27 850 selon que nous avons utilisé la première ou la seconde valeur pour le volume spécifique partiel.

Les déterminations à l'approche de l'équilibre de sédimentation nous ont fourni, selon la même alternative, des valeurs de 27 370 et de 27 625.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que l'ovoglycoprotéine possède une masse moléculaire moyenne de 27 600.

C - CONCLUSIONS.

L'ultracentrifugation nous a fourni des valeurs de 2,70 et 7,51 , respectivement, pour les constantes de sédimentation et de diffusion, pour une solution dans l'eau de l'ovoglycoprotéine. La première de ces valeurs est différente de celle trouvée par KETTERER. La seconde, ainsi que les valeurs de 0,676 ou 0,680 pour le volume spécifique partiel n'ont pas été précisées par cet auteur.

Le volume spécifique partiel de l'ovoglycoprotéine est faible comparativement à celui de la plupart des protéines qui est compris entre 0,70 et 0,75 (EDSALL (437)) ; il est toutefois situé dans la zone de 0,630 à 0,696 des valeurs qui caractérisent les glycoprotéines riches en glucides (GIBBONS (438)).

KETTERER a calculé une masse moléculaire de 24 400 sur la base de la composition en tryptophane. La valeur de 27 600 que nous proposons, d'après les données convergentes des méthodes hydrodynamiques, conduit donc à une discordance dans les résultats que nous essaierons de justifier en étudiant la composition de l'ovoglycoprotéine en acides aminés.

II - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE.

Si nous nous reportons à la figure 35 (p.119) du paragraphe où nous décrivons les résultats de nos recherches sur les méthodes de préparation de l'ovoglycoprotéine, nous remarquons que cette dernière est homogène

en électrophorèse de zone sur acétate de cellulose dans le tampon véronal de force ionique 0,07 et de pH 8,65. Elle forme cependant une tache qui s'étale jusqu'au niveau des ovalbumines du blanc d'oeuf. Cette image qui permet d'augurer une hétérogénéité, nous a incité à étudier le comportement électrophorétique de l'ovoglycoprotéine avec une solution tampon dont nous avons exploité, à plusieurs reprises, le haut pouvoir résolutif au cours des études dont nous exposons les résultats dans les chapitres suivants. Nous avons en outre déterminé les points isoélectriques en appliquant la méthode d'électrofocalisation.

A - METHODES.

1° - L'ELECTROPHORESE DE ZONE, a été effectuée sur des feuilles d'acétate de cellulose (Collogel) avec une solution d'acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, sous une tension de 11 V/cm, pendant 3 h 30.

2° - L'ELECTROFOCALISATION a été conduite selon le protocole expérimental général décrit à propos de l'ovoinhibiteur (p. 68) et, pour l'ovoglycoprotéine avec les conditions particulières suivantes :

- Poids de protéide analysé : 50 mg
- Zone de pH de la solution d'ampholytes : 3 - 5.
- Position des électrodes dans la colonne : anode au sommet, cathode en bas.

B - RESULTATS.

L'hétérogénéité que nous soupçonnions, à l'examen des électrophorégrammes d'ovoglycoprotéine en tampon alcalin, se manifeste sans la moindre ambiguïté sur l'électrophorèse reproduite à la figure 37 (p.127) qui révèle la présence de 9 bandes dont les vitesses relatives de migration anodique et les proportions relatives sont précisées page 128.

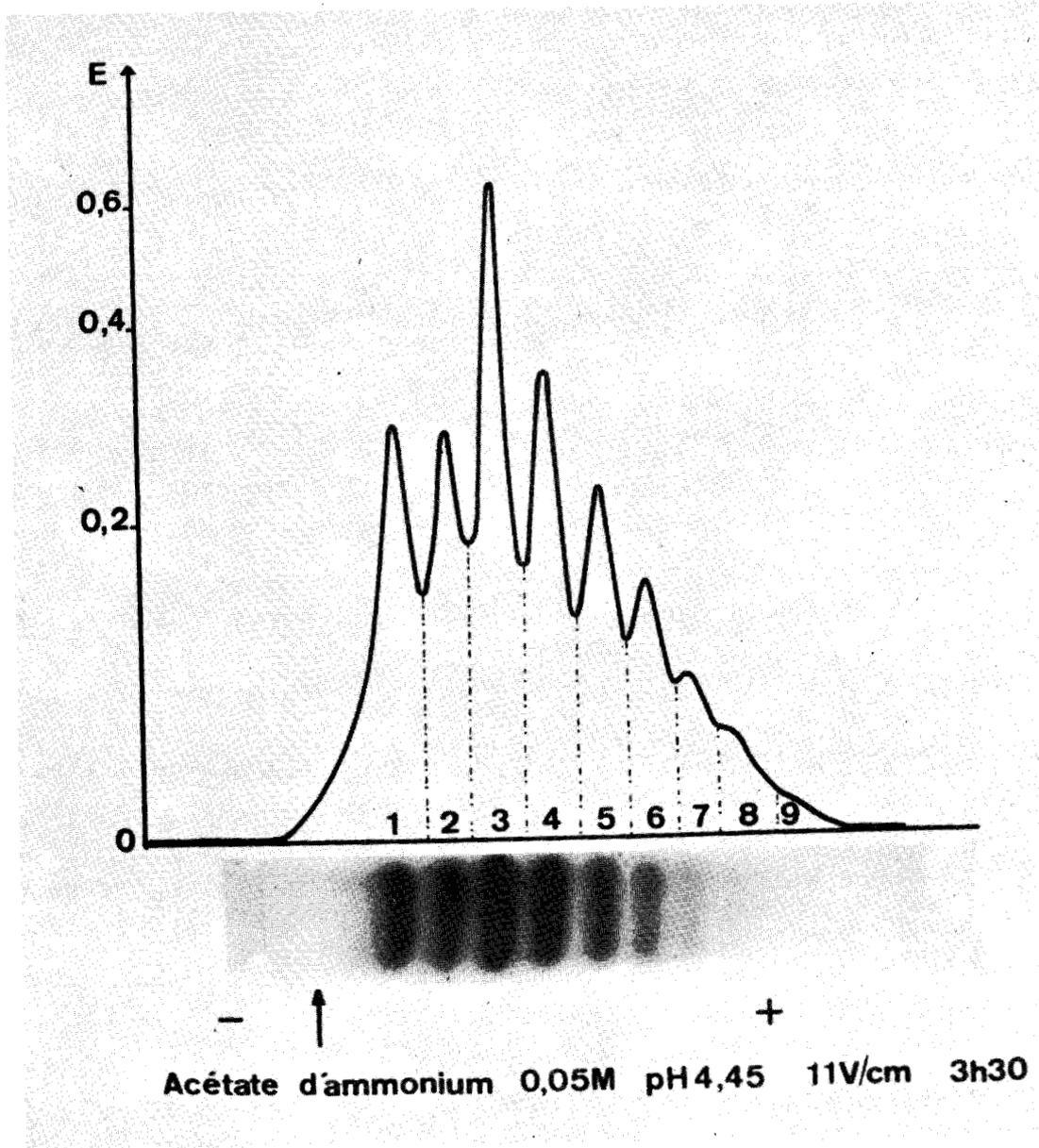


Figure 37

Electrophorèse sur acétate de cellulose en tampon acétate d'ammonium de l'ovoglycoprotéine obtenue par notre procédé personnel et courbe d'enregistrement densitométrique de l'électrophorégramme révélé par une coloration double à l'Amidoschwarz et à la nigrosine.

E : densité optique ; pour la signification des chiffres voir le texte (p.128).

	Désignation des bandes								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Comportement anodique(*)	1	1,7	2,3	3,1	3,8	4,4	5	5,4	6
Proportions relatives(**)	20	14	19	16	12	8	5	5	1

L'électrofocalisation confirme parfaitement ces résultats. La mesure du pH dans les effluents de colonne correspondant au sommet des pics du diagramme densitométrique à 280 nm représenté à la figure 38 (p.129) nous a permis de déterminer les points isoélectriques des fractions qui sont égaux pour les fractions de 1 à 9 respectivement à 4,64 ; 4,55 ; 4,50 ; 4,45 ; 4,28 ; 3,86 ; 3,53 ; 3,44 et 3,35.

C - CONCLUSIONS.

En électrophorèse de zone sur acétate de cellulose en tampon alcalin, l'ovoglycoprotéine migre vers l'anode en une tache qui reste homogène. En milieu acide, elle conserve son comportement anodique mais se dissocie en 9 bandes dont les points isoélectriques déterminés par électrofocalisation varient entre 4,64 pour la fraction la plus lente et 3,35 pour la fraction la plus rapide.

III - PROPRIETES OPTIQUES.

A - RESULTATS.

1° - ABSORPTION DE LA LUMIERE.

Des solutions à 0,1 g d'ovoglycoprotéine pour 100 ml d'eau à pH 7 montrent un maximum d'absorption à 278 nm. La densité optique mesurée avec une cellule de 1 cm d'épaisseur, à cette longueur d'onde, permet de fixer le coefficient d'extinction $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ de l'ovoglycoprotéine à 5,55.

(*) Vitesse de migration relative calculée par rapport à la fraction 1.

(**) En p.100 des protéides totaux (déterminations effectuées par intégration des pics de la courbe d'enregistrement de l'électrophorégramme de la Fig.37 (p.127)).

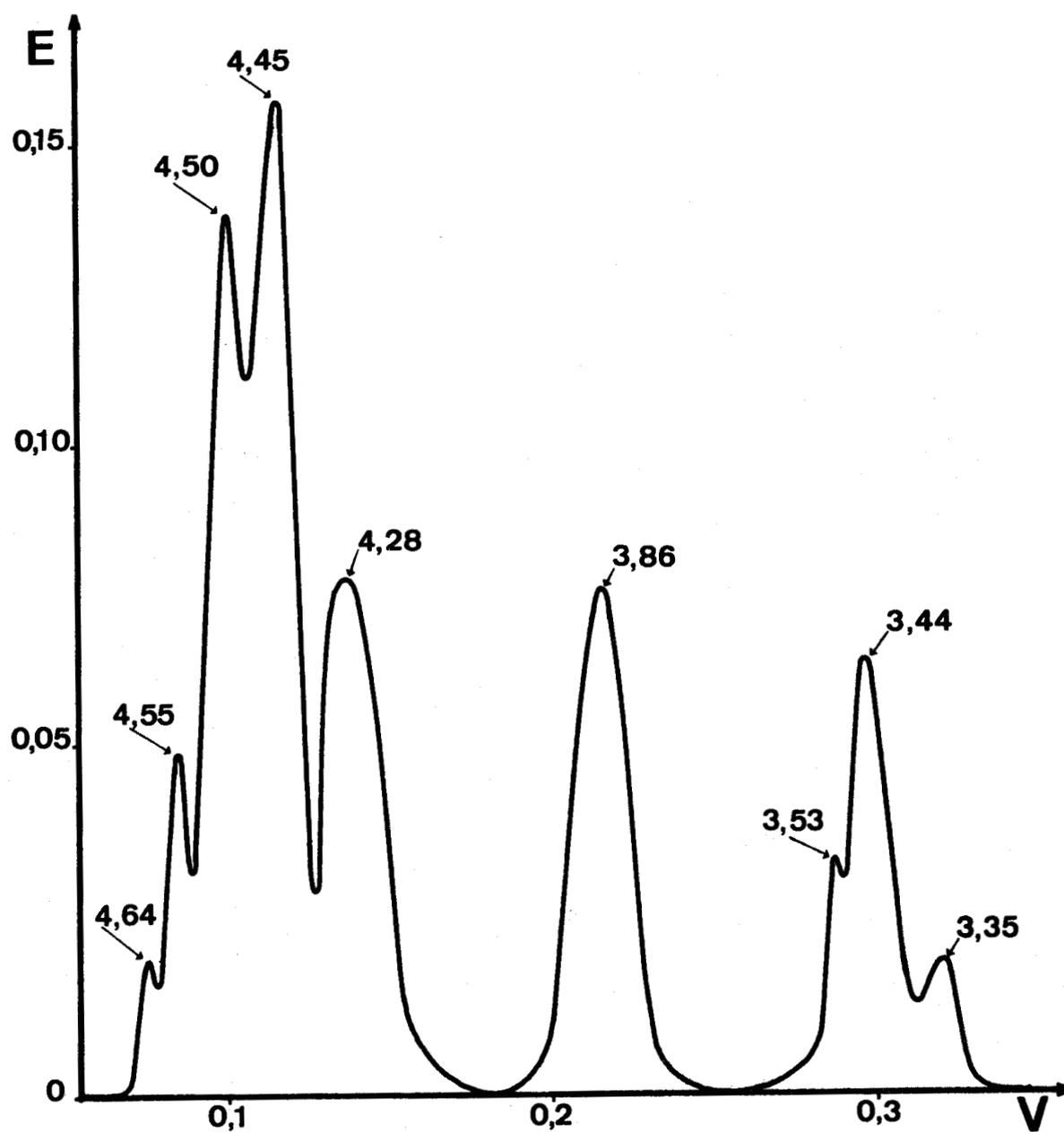


Figure 38

Electrofocalisation dans une solution d'ampholytes (pH 3 à 5) de l'ovoglycoprotéine obtenue par notre procédé personnel.

V : volume des effluents exprimés en litre.

E : densité optique à 280 nm.

2° - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE.

Nous avons mesuré l'angle de rotation de la lumière polarisée qui traverse des solutions à 1 g d'ovoglycoprotéine pour 100 ml d'eau, ajustées à pH 7, à 20°C. Des valeurs que nous avons obtenues à 546 nm, nous avons déduit le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{546\text{nm}}^{20^\circ} = -65^\circ,8$.

B - CONCLUSIONS.

La valeur de 5,55 que nous avons obtenue pour le coefficient d'extinction $\epsilon_{278\text{ nm}}^{1\text{p.}100}$ s'éloigne notablement de celle de 3,3 déterminée par KETTERER dans les mêmes conditions. Le pouvoir rotatoire spécifique que KETTERER n'a pas mesuré est égal à $-65^\circ,8$.

Ces résultats sont conformes à ceux qui ont été décrits pour de nombreux glycoprotéides et en particulier pour les glycoprotéines riches en glucides comme la glycoprotéine α_1 acide sérique (JEANLOZ) (439).

3 - COMPOSITION CHIMIQUE.

Dans le paragraphe consacré à l'étude des méthodes de préparation de l'ovoglycoprotéine nous avons vu que l'application du procédé de KETTERER ne fournit pas un protéide pur. Il n'est donc pas étonnant que la détermination de la composition en glucides que nous avons utilisée comme critère chimique d'homogénéité, nous ait donné des résultats différents de ceux obtenus par KETTERER.

En dehors des déterminations de la tyrosine, du tryptophane et de l'acide aminé N-terminal, KETTERER n'a pas étudié la composition en acides aminés.

Nous avons donc repris l'étude de la composition chimique de l'ovoglycoprotéine et nous envisagerons successivement :

- Les compositions centésimale et molaire en glucides.
- Les compositions centésimale et molaire en acides aminés.
- L'identification des acides aminés N- et C- terminaux.

I - MATERIEL ET METHODES.

Nous avons appliqué les procédés classiques de dosage des glucides, et de dosage chromatographique et électrophorétique des oses et des acides aminés, à la fraction d₂ obtenue par chromatographie de recyclage de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER sur DEAE-cellulose (voir procédé personnel de préparation de l'ovoglycoprotéine ; p.113).

II - RESULTATS.

A - COMPOSITIONS EN GLUCIDES.

1° - COMPOSITION CENTESIMALE.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XVII (p.122). Ils ont déjà été commentés à la page 120. Qu'il nous suffise donc de rappeler que si les teneurs en oses et en osamines concordent avec celles obtenues par KETTERER, la composition en acide sialique, au contraire, est très différente ; la fraction d₂ contient, en effet, deux fois plus d'acide sialique que les préparations de KETTERER.

Les analogies de composition en oses et en osamines et la discordance des résultats concernant les teneurs en acides sialiques peuvent s'expliquer par la présence, dans les préparations de KETTERER, de protéides contaminants, que nous avons signalés plus haut et en particulier, de certaines fractions d'ovomucoïde qui possèdent comme nous le verrons dans la deuxième partie de ce mémoire, des teneurs en oses et en osamines égales ou supérieures à celles de l'ovoglycoprotéine mais qui sont plus pauvres en acide sialique.

2° - COMPOSITION MOLAIRES.

-a- Les oses "neutres".

La chromatographie sur papier après hydrolyse chlorhydrique de l'ovoglycoprotéine ne révèle que la présence de mannose et de galactose dans le rapport molaire 1,75. Cette valeur légèrement inférieure à celle de KETTERER (mannose/galactose = 2) peut s'expliquer comme précédemment

par la présence d'ovomucoïde dans les préparations de cet auteur. L'ovomucoïde contient en effet les mêmes hexoses mais dans un rapport molaire généralement supérieur (mannose/galactose = 5).

Sur la base du rapport molaire que nous avons déterminé et de la composition centésimale en oses "neutres", nous avons calculé qu'une mole d'ovoglycoprotéine de masse moléculaire 27 600 contient 22 résidus d'hexose dont 8 résidus de galactose et 14 de mannose.

-b- L'osamine.

En appliquant le procédé de désamination oxydative des osamines suivie de l'identification chromatographique des pentoses apparus de GARDELL et coll. (440), la méthode chromatographique sur échangeurs de cations de GARDELL (441) et la technique électrophorétique d'identification des osamines N-réacétylées selon le protocole expérimental de ROSEMAN et LUDOWIEG (442), nous avons confirmé le résultat obtenu par KETTERER avec le procédé de désamination oxydative de STOFFYN et JEANLOZ (443).

L'ovoglycoprotéine ne contient qu'une seule osamine : la N-acétylglucosamine dont le nombre de résidus par mole de masse moléculaire 27 600 peut être fixé à 19.

-c- L'acide sialique.

L'acide sialique a été identifié par chromatographie descendante sur papier dans le système solvant de SVENNERHOLM (444), à l'acide N-acétylneuraminique. Par la même méthode, KETTERER avait déjà caractérisé le même composant dont une mole d'ovoglycoprotéine contient 6 résidus d'après nos déterminations.

B - COMPOSITION EN ACIDES AMINES.

1° - DETERMINATION DES COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES.

Le dosage des acides aminés à l'auto-analyseur Technicon selon le procédé général de PIEZ et MORRIS (445) et la détermination particulière du tryptophane par les méthodes spectrophotométrique de GOODWIN et MORTON (446) et colorimétrique de SPIES et CHAMBERS (447) nous ont permis de dresser le tableau de résultats XVIII (p.133). L'ovoglycoprotéine est composée de 132 résidus d'acides aminés dont 27 acides aminés dicarboxyliques, 19 acides aminés basiques, 19 acides aminés hydroxylés aliphatiques, 41 acides aminés neutres aliphatiques, 8 acides aminés aromatiques, 6 résidus de proline et 9 résidus de cystéine.

Tableau XVIII

Compositions centésimale et molaire* en acides aminés de l'ovoglycoprotéine du blanc d'oeuf de poule.

Nature des acides aminés	g / 100g de protéide	Nombre de résidus
Acide aspartique	5,2	12
Acide glutamique	7,3	15
Arginine	2,7	5
Histidine	3,3	6 ou 7
Lysine	3,3	7
Alanine	3,2	12
Cystine / 2	3,4	9
Glycocolle	1,5	7
Isoleucine	1,8	4
Leucine	4,3	10
Méthionine	1,6	3
Phénylalanine	3,2	6
Proline	2,3	6
Sérine	2,9	9
Thréonine	3,9	10 ou 11
Tryptophanne	0	0
Tyrosine	1,2	2
Valine	2,9	8

* Pour une masse moléculaire de 27 600.

Les seules valeurs que nous pouvons comparer aux résultats de KETTERER sont celles qui concernent les teneurs en tryptophane et en tyrosine respectivement égales à 0,85 p.100 et à 2,35 p.100 selon cet auteur. Elles sont discordantes. Le tryptophane en particulier, sur la teneur duquel KETTERER s'était fondé pour déterminer la masse moléculaire de l'ovoglycoprotéine, n'a pas pu être décelé avec les méthodes que nous avons employées et tout spécialement avec la méthode spectrophotométrique, celle-là même que KETTERER a utilisée. Deux alternatives sont donc possibles : ou bien les différentes fractions électrophorétiques que nous avons caractérisées ne possèdent pas toutes la même composition en tryptophane et KETTERER aurait isolé non pas l'ovoglycoprotéine totale mais seulement quelques unes des fractions dont les fractions pondéralement mineures mais qui contiendraient du tryptophane ; ou bien les préparations étudiées par KETTERER étaient contaminées, comme l'étaient les nôtres obtenues par le même procédé, par des protéides relativement riches en tryptophane comme le lysozyme par exemple.

2° - DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX.

Le seul DNP-amino-acide que nous avons pu détecter dans les hydrolysats de DNP-ovoglycoprotéine a été la DNP-thréonine. Nous confirmons ainsi le résultat de KETTERER.

L'hydrazinolyse que KETTERER n'a pas effectuée libère un seul amino-acide : le glycocolle qui se trouve donc en position C-terminale. Ces résultats bien que qualitatifs sont en faveur de la présence d'une seule chaîne polypeptidique dans l'ovoglycoprotéine.

III - CONCLUSIONS

L'ovoglycoprotéine qui ne semble contenir qu'un seul acide aminé N-terminal : la thréonine et un seul acide aminé C-terminal : le glycocolle, pourrait être formée d'une seule chaîne polypeptidique constituée par l'enchaînement de 132 acides aminés. Le tryptophane dont la teneur avait constitué pour KETTERER la base pour le calcul de la masse moléculaire, n'a pas pu être décelé, bien que nous ayons utilisé deux méthodes différentes de dosage dont celle utilisée par KETTERER lui même.

Le groupement glycanique de l'ovoglycoprotéine est formé de 8 galactoses, 14 mannoses, 19 N-acétylglucosamines et 6 acides N-acétylneuraminiques par mole.

Hors la composition centésimale en oses "neutres" et en osamines et la nature de l'acide N-terminal, nos résultats sont soit en désaccord avec ceux de KETTERER, soit originaux. Tous ont été tirés ou déduits de l'étude d'un protéide homogène en immuno-électrophorèse, aucun cependant n'a été reproduit un nombre suffisant de fois pour pouvoir être considéré comme définitif.

4 - PROPRIETES BIOLOGIQUES.

KETTERER a signalé que l'ovoglycoprotéine n'était ni un inhibiteur tryptique, ni un inhibiteur chymotryptique. A l'occasion de ces études, toutefois, il avait constaté l'impureté de ses préparations puisqu'il imputait à des traces d'ovomucoïde la légère activité anti-tryptique qu'il observait parfois.

Nous avons repris cette étude pour vérifier les résultats de KETTERER certes, mais surtout, pour avoir une preuve supplémentaire de la pureté de nos préparations.

I - METHODES.

Nous avons mesuré les activités estérasiqes et protéolytiques des trois enzymes : trypsine (3.4.4.4.), chymotrypsine (3.4.4.5) et subtilisine (3.4.4.16) en appliquant les méthodes spectrophotométriques et électrophorétiques que nous avons déjà citées à propos de l'étude de l'ovoinhibiteur.

II - RESULTATS.

Bien que la méthode de RHODES, HILL et FEENEY (448) de détermination de l'activité estérasiqes des protéinases soit très sensible, pas même un début d'inhibition de 25 µg de trypsine, de chymotrypsine ou de subtilisine n'a pu être décelé, même en présence de 5 mg de nos préparations d'ovoglycoprotéine (fraction α_2). C'est pourquoi nous n'avons pas reproduit dans ce mémoire les courbes obtenues, les enzymes conservant leur activité maximale quelqu'ait été la concentration en ovoglycoprotéine dans le mélange en réaction.

Toutefois, pour illustrer nos résultats, nous présentons à la figure 39 (p.137) les électrophorèses effectuées sur des mélanges contenant des poids égaux d'ovoglycoprotéine d'une part et de trypsine, de chymotrypsine et de subtilisine d'autre part, c'est à dire dans un rapport molaire ovoglycoprotéine / enzyme approximativement égal à 1 dans les trois cas.

En étudiant les interactions entre ces mêmes enzymes et l'ovoinhibiteur, nous avons vu que les enzymes et l'inhibiteur se combinent pour former un complexe dont le comportement électrophorétique est intermédiaire entre celui de l'enzyme et celui de l'inhibiteur. Dans le cas présent, les mélanges que nous avons comparés au comportement électrophorétique de l'ovoglycoprotéine et des enzymes, montrent deux bandes : l'une cathodique au niveau des enzymes, l'autre anodique au niveau de l'ovoglycoprotéine. Entre les deux, aucune trace de complexe ovoglycoprotéine-enzyme n'est décelable.

III - CONCLUSIONS.

L'ovoglycoprotéine n'inhibe ni la trypsine, ni la chymotrypsine, ni la subtilisine. Ces résultats confirment bien ceux obtenus par KETTERER et constituent une preuve supplémentaire de la pureté de nos propres préparations.

5 - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE L'OVOGLYCOPROTEINE.

L'application du procédé de KETTERER de préparation de l'ovoglycoprotéine nous a fourni des préparations hétérogènes en électrophorèse et en immuno-électrophorèse. Tous les essais de purification sur DEAE-cellulose ou sur CM-cellulose que nous avons tentés ont échoué. Nous avons donc été conduit à mettre au point un procédé original de chromatographie par recyclage sur DEAE-cellulose de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER, avec un tampon phosphate et un gradient discontinu en NaCl, qui nous a permis d'obtenir des préparations très pures d'ovoglycoprotéine dont on peut fixer la teneur dans le blanc d'oeuf à 0,5 p.100 des protéides totaux.

L'analyse immuno-électrophorétique nous a permis d'identifier la ligne de précipitation de l'ovoglycoprotéine à l'arc de comportement α_1 de l'immuno-électrophorégramme du blanc d'oeuf et de l'ovomucoïde de FORSYTHE et FOSTER.

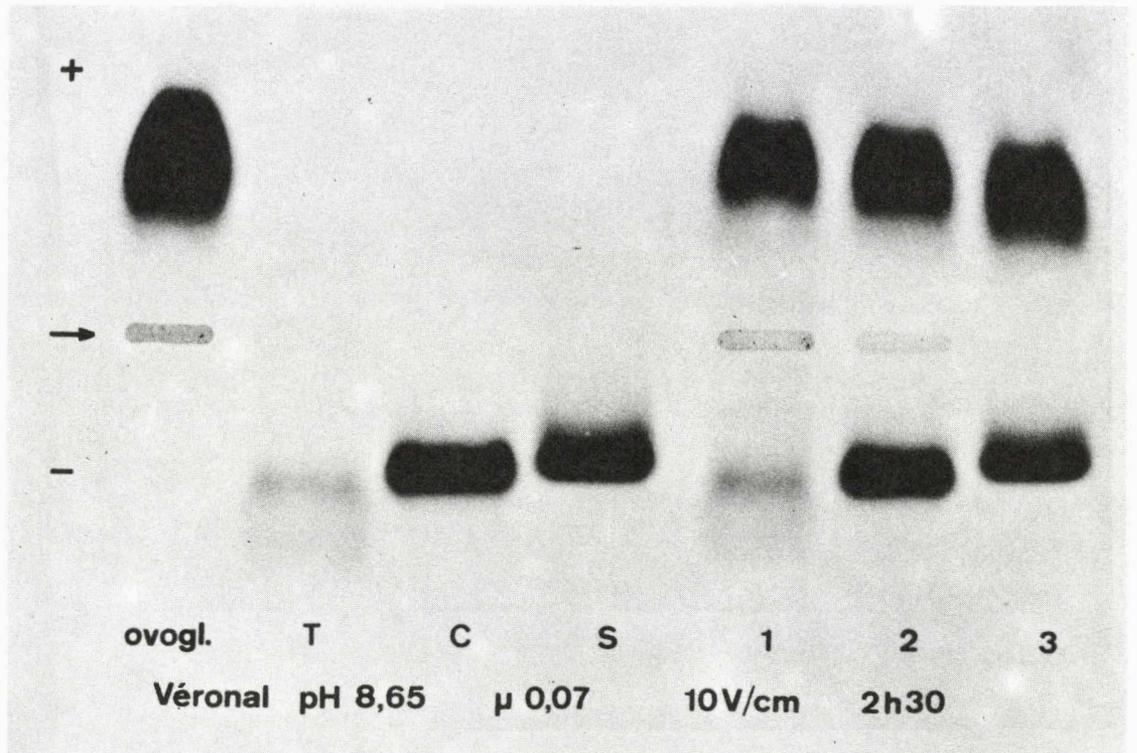


Figure 39

Electrophorèse sur acétate de cellulose de l'ovoglycoprotéine obtenue par notre procédé personnel (ovogl.), de la trypsine (T), de la chymotrypsine (C), de la subtilisine (S) et des mélanges à concentration égale de l'ovoglycoprotéine avec la trypsine (1), la chymotrypsine (2) et la subtilisine (3).

Les résultats de notre étude des propriétés physiques et chimiques de l'ovoglycoprotéine sont généralement en désaccord avec ceux de KETTERER. En effet, les valeurs de 2,47 et de 2,70 obtenues respectivement par cet auteur et par nous-même pour la constante de sédimentation S_{20w}^0 , ne concordent pas, celles qui concernent la masse moléculaire, pas davantage. Sur les données fournies par l'ultracentrifugation, tant à l'approche de l'équilibre de sédimentation qu'en appliquant la formule de SVEDBERG avec des valeurs de D_{20w}^0 7,51 et de \bar{V} (volume spécifique partiel) 0,676 ou 0,680 que KETTERER n'a pas déterminées, nous avons calculé une masse moléculaire de 27 600. En se fondant sur la teneur en tryptophane, acide aminé que nous n'avons pas pu déceler dans nos préparations, KETTERER a trouvé une masse moléculaire de 24 400. Bien que la valeur de 27 600 que nous proposons pour la masse moléculaire de l'ovoglycoprotéine doive encore être confirmée, si l'on admet que les divers critères à l'épreuve desquels nos préparations se sont révélées pures, sont valables, alors il nous faut admettre que la valeur proposée par KETTERER est inexacte.

Si KETTERER a observé deux pics en électrophorèse libre dans des tampons acétates de force ionique 0,1 et de pH 4,3 ou 4, nous avons, en électrophorèse de zone sur acétate de cellulose avec une solution d'acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, caractérisé la présence de 9 bandes dont nous avons précisé les vitesses anodiques relatives, les proportions relatives ainsi que les points isoélectriques.

Les résultats concernant les propriétés optiques ne concordent pas davantage. KETTERER a obtenu un coefficient d'extinction $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{-1} \frac{\text{p.100}}{\text{cm}}$ 3,80 alors que nous l'avons trouvé égal à 5,55. Nous avons, en outre, déterminé pour l'ovoglycoprotéine un pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{546 \text{ nm}}^{20^\circ}$ - 65°8.

Les propriétés chimiques n'échappent pas à la discordance. Si les recherches qualitatives concernant l'identification des oses "neutres", des osamines et des acides sialiques sont convergentes et permettent d'affirmer la présence de galactose, de mannose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylneuraminique dans la fraction glycanique de l'ovoglycoprotéine, il n'en est pas de même du point de vue des résultats quantitatifs. En effet, si les teneurs en oses "neutres" et en osamines sont conformes, le taux d'acide sialique de nos préparations est deux fois plus élevé que celui des préparations étudiées par KETTERER.

Les discordances importantes s'arrêtent à ce niveau puisque KETTERER a très peu étudié la fraction protéique en dehors des déterminations

de la composition en tyrosine et en tryptophane pour lesquelles les résultats sont une fois de plus divergents , et de l'identification de l'acide N- terminal à la thréonine qu'au contraire , nous avons confirmé. A ces résultats il faut ajouter l'apport original de nos recherches : la caractérisation du glycocolle à l'extrémité C- terminale de la protéine dont nous avons déterminé la composition centésimale et molaire en acides aminés.

Enfin, les recherches de KETTERER et les nôtres permettent de conclure que l'ovoglycoprotéine ne possède aucune activité anti-protéinasique vis-à-vis de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine.

La discordance pratiquement constante entre les résultats de KETTERER et les nôtres peut s'expliquer d'une manière générale par la présence d'impuretés dans les préparations étudiées par KETTERER. Dans notre cas, nous avons analysé des préparations homogènes en les soumettant à l'épreuve de l'immuno-électrophorèse, épreuve que nous considérons comme l'un des critères de pureté le plus sûr, tout au moins dans le cadre du problème dont nous traitons dans ce mémoire et qui porte sur l'étude de protéides dont certains possèdent des masses moléculaires et des caractéristiques physico-chimiques très voisines.

LA RIBOFLAVOPROTEINE

1 - PREPARATION

Nous décrirons successivement les méthodes de préparation de la riboflavoprotéine et de son apo-dérivé : l'apoflavoprotéine.

I - PREPARATION DE LA RIBOFLAVOPROTEINE.

Nous avons appliqué le procédé original de RHODES, BENNETT et FEENEY (449) que nous avons, en outre, tenté d'améliorer. Nous exposerons donc tout d'abord, la méthode de RHODES et al., puis la modification que nous avons apportée à celle-ci.

L'application de ces procédés nous a fourni des fractions qui ont été systématiquement soumises aux analyses électrophorétiques sur acétate de cellulose et immuno-électrophorétiques, dans le but de préciser le degré de leur hétérogénéité.

A - APPLICATION DE LA METHODE DE RHODES, BENNETT ET FEENEY.1° - PRINCIPE.

Le blanc d'oeuf est soumis à un fractionnement chromatographique sur DEAE-cellulose dans des conditions telles que la majorité des protéides qu'il renferme ne soit pas retenue par l'échangeur d'anions. Un tampon de force ionique élevé permet alors de déplacer la riboflavoprotéine fixée.

2° - MODE OPERATOIRE.

Un litre de blanc d'oeuf rapidement homogénéisé à l'aide d'un "mixer", est dialysé à 2°C pendant trois jours contre une solution tamponnée d'acétate d'ammonium de pH 4,3 (solution d'acide acétique 0,1 M ajustée au pH avec une solution concentrée d'ammoniaque), celle-ci étant renouvelée deux fois par jour. La solution débarassée par filtration du précipité d'ovomucine qui s'est formé au cours de la dialyse et qui contient dès lors environ 115 g

de protéides est passée sur des colonnes (5 x 90 cm) de DEAE-cellulose préalablement stabilisée avec la solution tamponnée précédente. La cellulose est ensuite "lavée" avec le même tampon jusqu'à ce que la densité optique (à 280 nm) de la solution effluente s'abaisse à 0,02. Un premier pic (pic A) (Fig. 40 ; p.142) très important est ainsi obtenu. Le passage d'un tampon acétate d'ammonium 0,1 M + NaCl 0,5 M de pH 3,5 "décroche" la riboflavoprotéine qui jusqu'alors était fixée au sommet de la colonne en un bel anneau jaune et donne un second pic (pic C) précédé d'un pic B mineur, légèrement coloré en jaune.

Les tubes intensément colorés en jaune et qui correspondent à la totalité du pic C, sont rassemblés et représentent la fraction "Pic C".

3° - RESULTATS.

Les résultats que nous avons obtenus en appliquant le procédé original de RHODES et al. sont illustrés par le diagramme chromatographique de la figure 40 (p.142), les électrophorèses et immuno-électrophorèses de la figure 41 (p.143).

Les fractions A, B et C fournissent respectivement 104,325 g 0,450 g et 0,925 g de protéides pour 115 g de protéides soumis au fractionnement. Le rendement de la chromatographie a donc été de 92 p.100 environ.

Le pic A présente une image électrophorétique très comparable à celle que donne le blanc d'oeuf total. Il en est de même du pic B qui contient toutefois une faible quantité d'un composant dont la vitesse de migration électrophorétique est celle d'une pré-albumine.

Le pic C qui possède une coloration jaune très intense, contient la riboflavoprotéine contaminée par du lysozyme, de la conalbumine, de l'ovomucoïde, de l'ovoglycoprotéine et de l'ovalbumine. (Fig. 41 ; p.143). Le composant majeur, la riboflavoprotéine est homogène dans le tampon véronal de pH 8,65 que nous avons employé.

4° - CONCLUSION.

L'application du procédé original de RHODES et al. nous a fourni comme à ces auteurs, des préparations impures de riboflavoprotéine. La purification de cette dernière par un procédé chromatographique sur CM-cellulose que nous décrivons plus loin et qui a été préconisé par les mêmes auteurs, conduit directement à la préparation de l'apoflavoprotéine. Dans le but d'isoler la riboflavoprotéine pure, nous avons adopté un procédé personnel de chromatographie sur DEAE-cellulose.

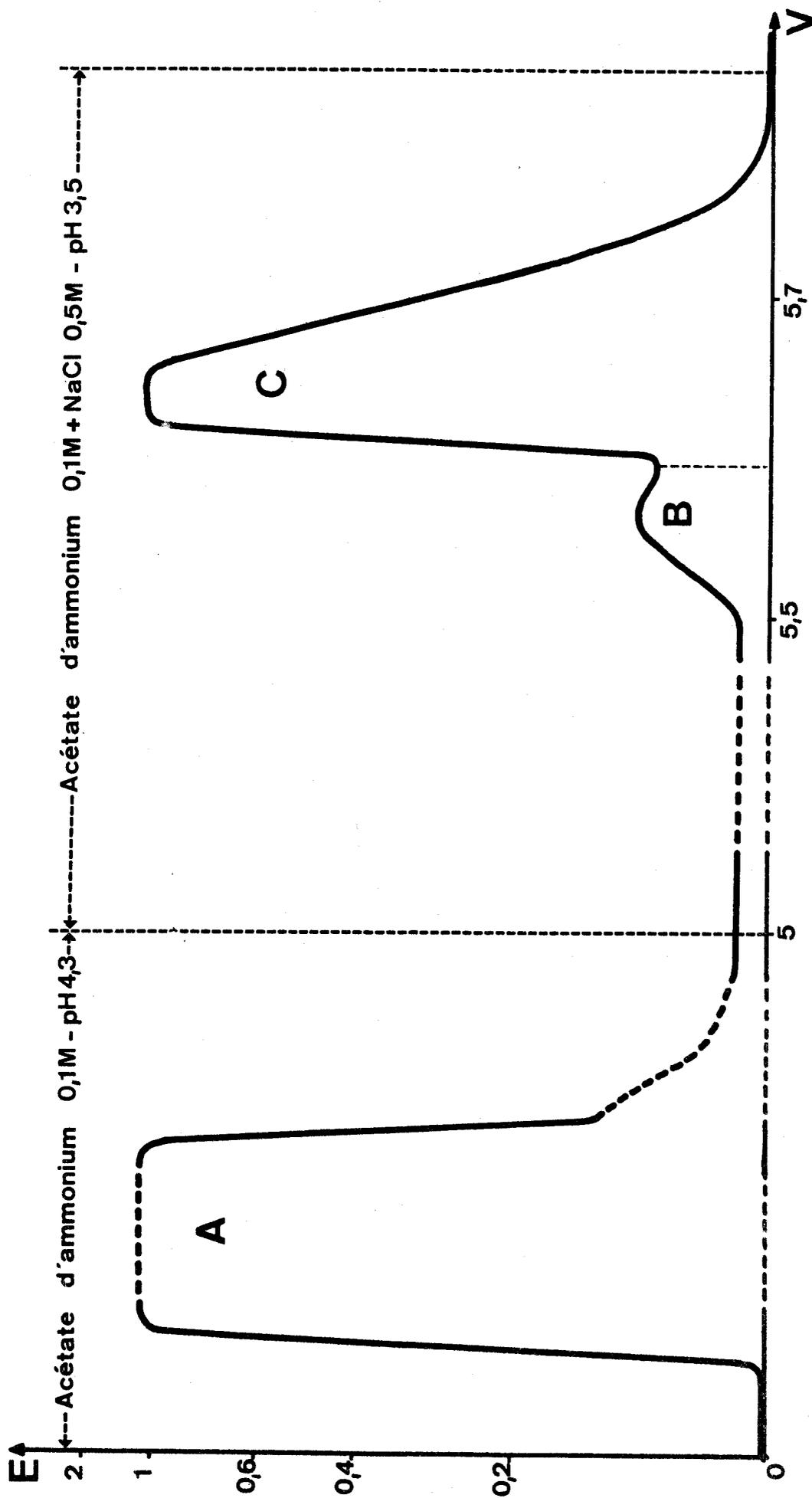


Figure 40

Préparation de la riboflavoprotéine par chromatographie du blanc d'oeuf sur DEAE cellulose selon le procédé de RHODES, BENNET et FEENEY (450).

En abscisses : volumes des effluents exprimés en litres. — En ordonnées : densité optique à 280 nm.

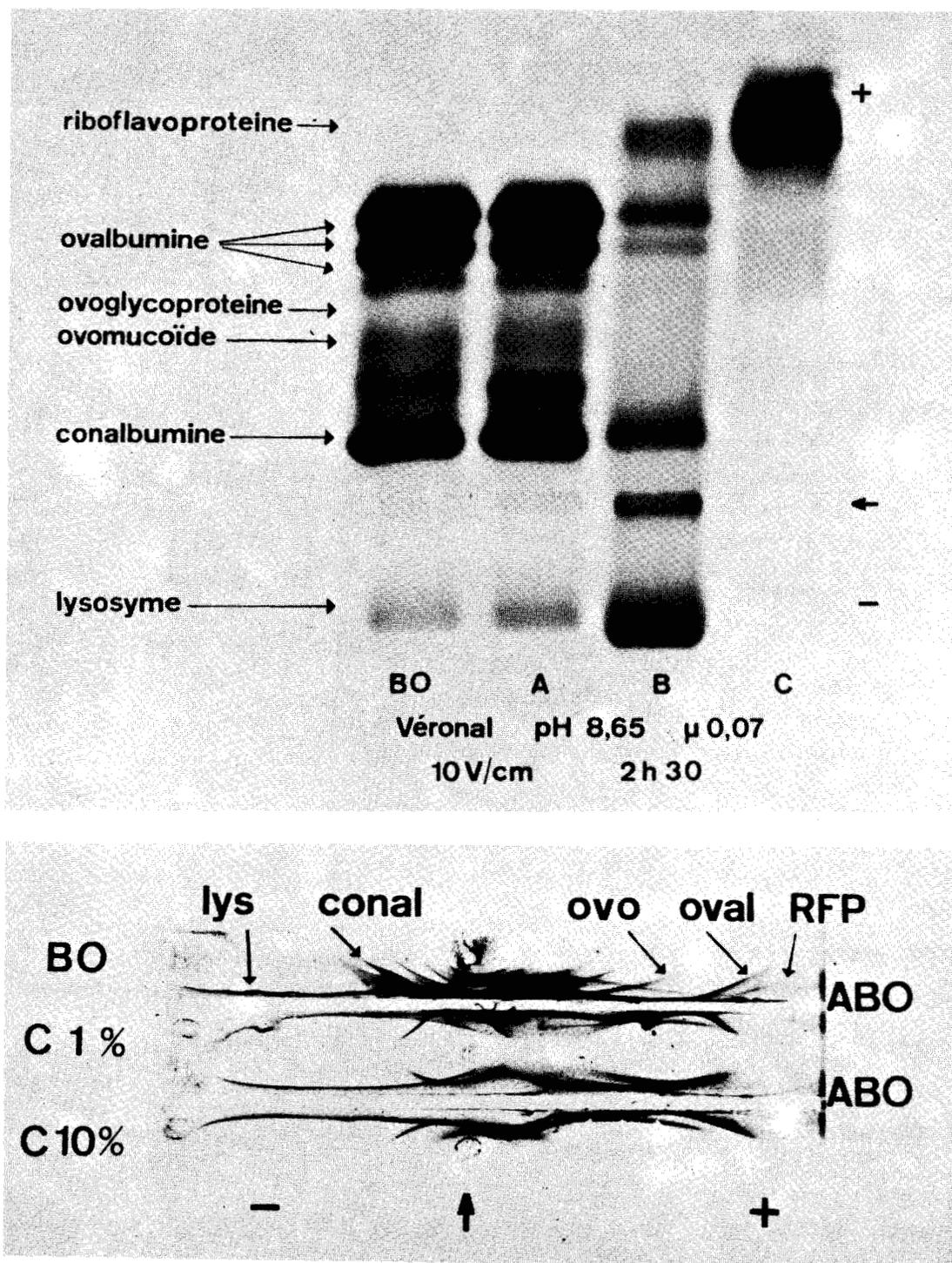


Figure 41

Electrophorèse sur acétate de cellulose des fractions A, B et C du chromatogramme de la page 142 et immuno-électrophorèse de la fraction C. Les électrophorégrammes ont été révélés par une double coloration à l'Amidoschwarz et à la nigrosine. ABO : sérum anti-protéides du blanc d'oeuf ; BO : blanc d'oeuf ; RFP : riboflavoprotéine ; conal : conalbumine ; lys : lysozyme ; oval : ovalbumine ; ovogl : ovoglycoprotéine ; ovo : ovomucoïde.

B - PROCÉDE PERSONNEL DE PURIFICATION DE LA RIBOFLAVO-
PROTEINE OBTENUE PAR LA METHODE DE RHODES, BENNETT
ET FEENEY.

1° - PRINCIPE.

Le pic C, obtenu par le procédé de RHODES et al., est soumis à une chromatographie sur DEAE-cellulose, d'abord avec des tampons de faible force ionique qui éliminent les impuretés, puis avec un tampon de force ionique élevée qui déplace la riboflavoprotéine.

2° - MODE OPERATOIRE.

Les protéides totaux du pic C (voir page 141) (925 mg en solution dans 10 ml de tampon phosphate 0,005 M de pH 8) sont soumis à la chromatographie sur des colonnes (2 x 40 cm) de DEAE-cellulose stabilisée avec un tampon phosphate 0,005 M de pH 8. Le passage successif de trois tampons de pH 8 (tampon n° 1 : phosphate 0,005 M ; tampon n° 2 : phosphate 0,005 M - NaCl 0,1 M ; tampon n° 3 : phosphate 0,005 M - NaCl 0,2 M) permet d'éliminer les impuretés. La riboflavoprotéine est ensuite éluée avec un tampon phosphate 0,005 M - NaCl 0,5 M de pH 8 (Fig. 42 ; p.145).

Les solutions effluentes sont dialysées et lyophilisées. Les protéides sont soumis à l'analyse électrophorétique (Fig. 43 a ; p.146) ; la fraction contenant la riboflavoprotéine a en outre été étudiée en immuno-électrophorèse (Fig. 43 b ; p.146).

3° - RESULTATS.

La chromatographie sur DEAE-cellulose du pic C, fournit les fractions a (5 mg), b (45 mg), c (35 mg) et d (750 mg). 835 mg de protéides ont été récupérés pour 925 mg du pic C ce qui correspond à un rendement de 90 p.100.

Le pic a contient du lysozyme.

Les fractions b et c donnent des pics hétérogènes et renferment toutes deux de l'ovomucoïde, de l'ovoglycoprotéine et de l'ovalbumine ; la fraction b contient en outre du lysozyme et de la conalbumine.

La fraction d est éluée de la colonne en un pic parfaitement symétrique et fournit 750 mg d'une poudre jaune. En électrophorèse sur acétate de cellulose elle possède le comportement pré-albuminique de la riboflavoprotéine.

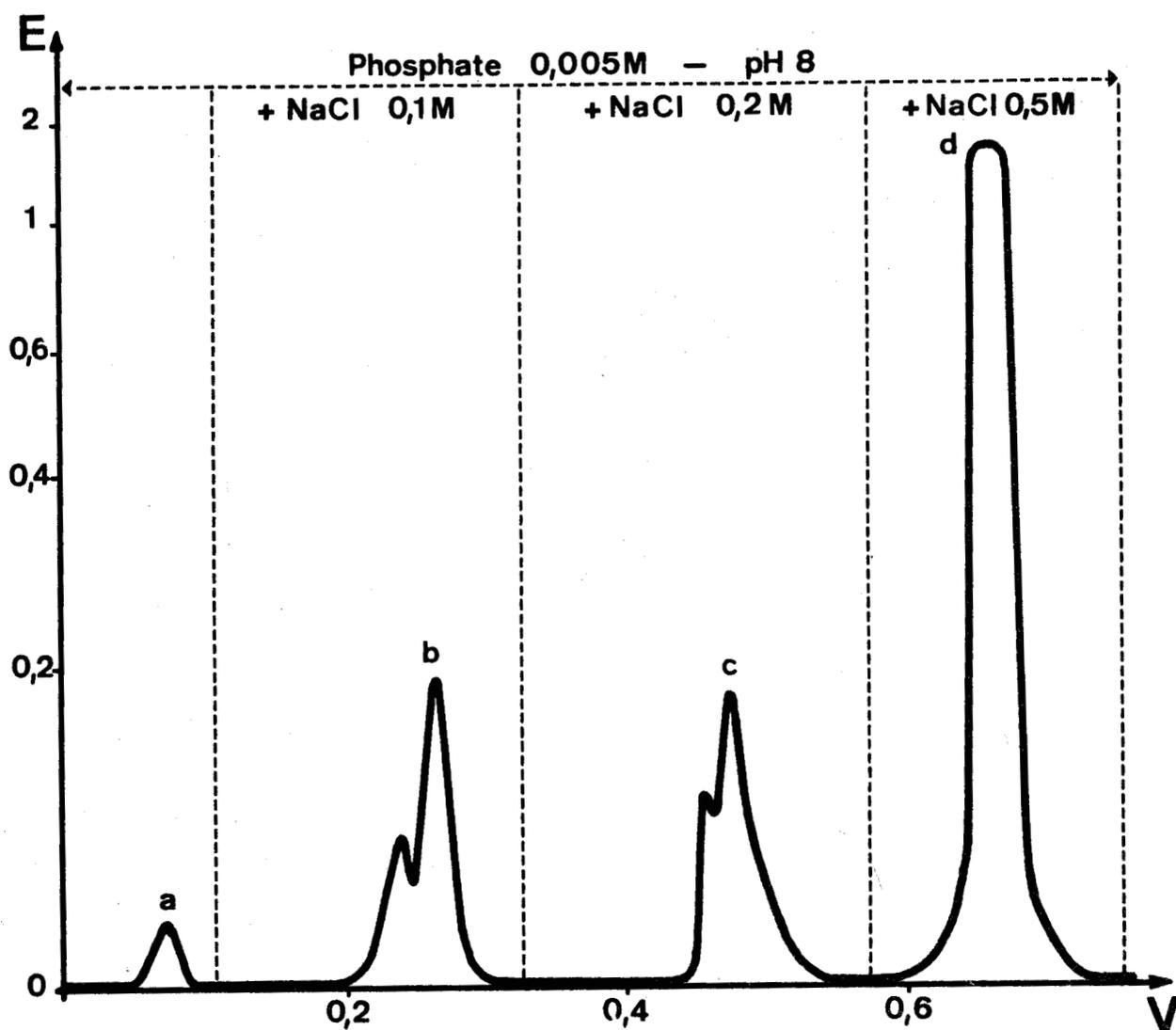


Figure 42

Purification de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf par chromatographie

du pic C sur D E A E cellulose.

En abscisses : Volume des effluents exprimés en litres.

En ordonnées : Densité optique à 280 nm.

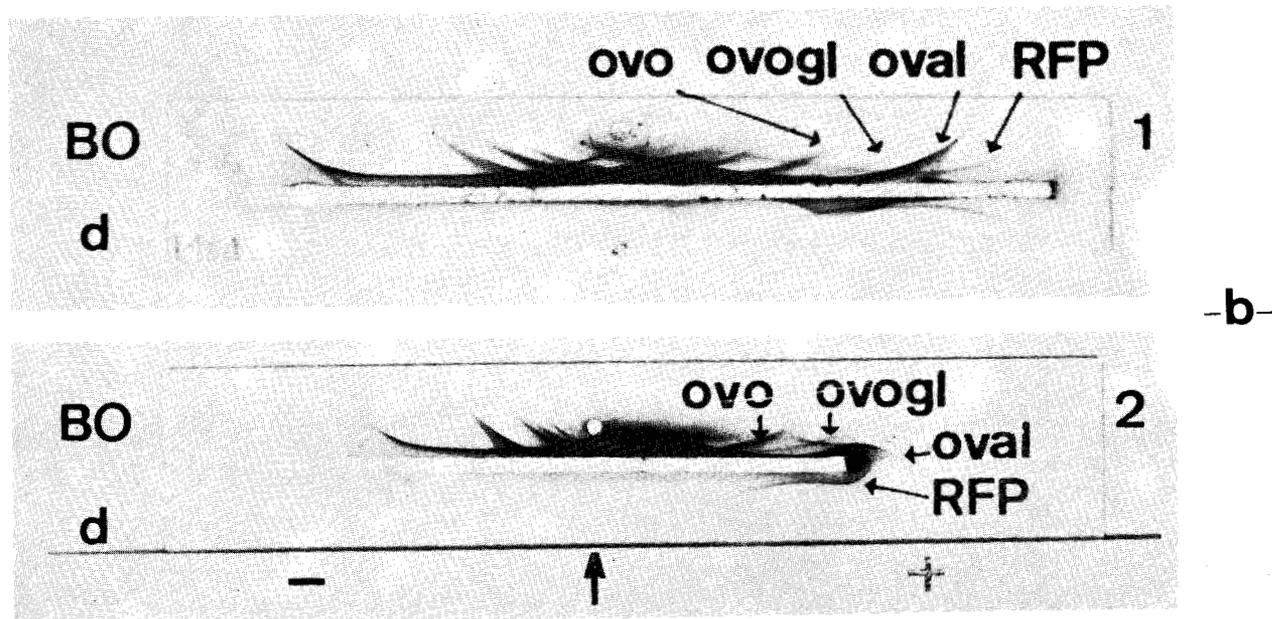
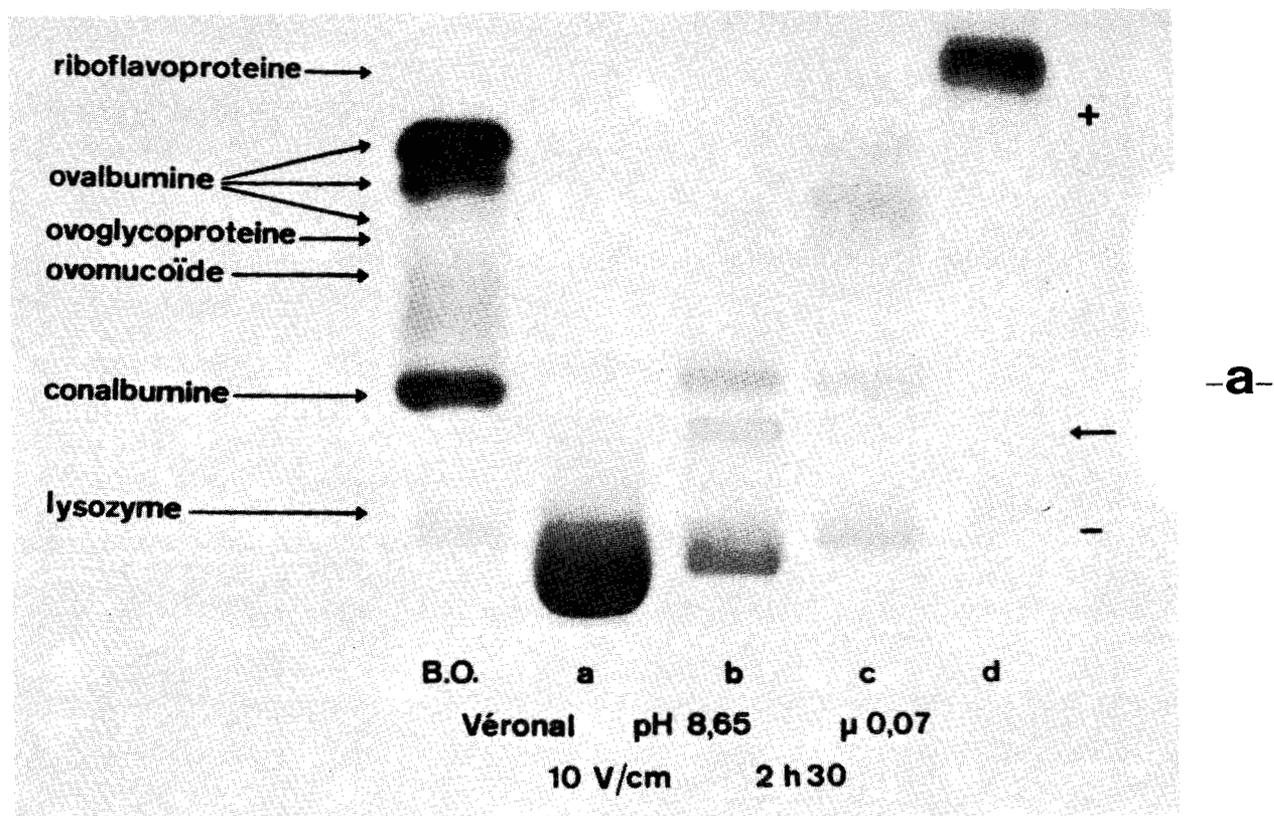


Figure 43

Electrophorèse sur acétate de cellulose (a) des fractions d'élution correspondant au diagramme chromatographique de la figure 42 (p.145) et immuno-électrophorèse (b) de la fraction d.

Pour la signification des abréviations, voir la légende de la figure 41 (p.143).

L'immuno-électrophorèse montre une homogénéité parfaite. Sur la plaque 1 de la figure 43 b (p.146) on ne caractérise en effet qu'un seul arc qui, sur la plaque 2, croise les lignes de précipitation de l'ovalbumine et de l'ovoglycoprotéine, mais se raccorde à celle de la préalbumine du blanc d'oeuf en une réaction d'identité totale.

Enfin la fraction d est homogène en ultracentrifugation (Fig.45 ; p. 153).

4° - CONCLUSIONS.

La chromatographie sur DEAE-cellulose du pic C, fournit des préparations pures de riboflavoprotéine. Le procédé que nous avons décrit constitue donc une amélioration de la méthode de RHODES et al..

Notre étude électrophorétique révèle le comportement de pré-albumine de la riboflavoprotéine. Ce résultat confirme ceux de BLUM et GAUDIN-HARDING (451) qui ont observé qu'en tampon véronal de pH 8,6, la riboflavoprotéine migre vers l'anode plus rapidement que l'ovalbumine.

L'analyse immuno-électrophorétique (que les auteurs précédents n'ont pas appliquée) révèle l'homogénéité de nos préparations et nous permet d'identifier le composant pré-albuminique du blanc d'oeuf à la riboflavoprotéine.

II - PREPARATION DE L'APOFLAVOPROTEINE.

A - PRINCIPE.

L'apoflavoprotéine est obtenue par passage de la riboflavoprotéine sur CM-cellulose selon le mode opératoire décrit par RHODES, BENNETT et FEENEY (452).

B - MODE OPERATOIRE.

750 mg de riboflavoprotéine pure, en solution à 10 p.100 dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 3,5 sont déposés au sommet de colonnes (2 x 30 cm) de CM-cellulose stabilisée dans le tampon précédent. L'élution des constituants est obtenue par l'application d'un gradient discontinu de pH (pH 3,5 - 4,3 - 4,5) en tampon acétate d'ammonium 0,1 M.

C - RESULTATS.

L'application du procédé de RHODES et al. de préparation de l'apoflavoprotéine nous a conduit à des résultats qui ne sont pas absolument comparables à ceux de ces auteurs. Certes, comme ces derniers, nous avons observé que la riboflavine se dissocie de l'apoflavoprotéine à pH inférieur à 4,2, qu'elle n'est pas retenue par la cellulose et qu'elle est éluée avec le tampon de pH 3,5.

En dehors de ce point commun, nos résultats sont divergents. En effet, RHODES et al. ont obtenu un fractionnement de l'apoflavoprotéine en deux composants d'importance pondérale identique et élués respectivement avec les tampons de pH 4,3 et 4,5. Au contraire dans toutes nos expériences le fractionnement nous a fourni deux pics d'importance très inégale. Le premier élué avec le tampon de pH 4,3 donne 460 mg d'apoprotéine 1 et le second 40 mg d'apoprotéine 2 (Fig. 44 ; p.149).

En électrophorèse sur acétate de cellulose, les apoflavoprotéines 1 et 2 sont homogènes et se comportent comme des pré-albumines. Toutefois l'apoflavoprotéine 1 possède la vitesse électrophorétique de la riboflavoprotéine dont elle est issue, tandis que l'apoflavoprotéine 2 est plus lente.

En immuno-électrophorèse (Fig. 44 ; p.149), la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine présentent entre elles des réactions d'identité totale. Cependant, la ligne de précipitation de l'apoflavoprotéine 2 est plus courte que celle de l'apoflavoprotéine 1.

D - CONCLUSIONS.

La chromatographie de la riboflavoprotéine sur CM-cellulose, selon le procédé de RHODES et al., nous a fourni des préparations d'apoflavoprotéine et a conduit à un fractionnement en deux composants. L'un majeur, représente 95 p.100 de la riboflavoprotéine et se comporte comme elle en électrophorèse, l'autre mineur, plus lent n'en représente que 5 p.100. Ce résultat est en désaccord avec ceux de RHODES et al. qui ont obtenu des quantités égales des deux apoprotéines. D'autre part, ces auteurs n'ont pas étudié le comportement électrophorétique de la riboflavoprotéine mais seulement celui des deux apoflavoprotéines qui mélangées en quantités égales se distinguent alors par leur mobilité. Se fondant sur les teneurs en phosphate des deux fractions et qui seraient égales à 0,8 p.100 dans l'apoflavoprotéine éluée à pH 4,3 et à 0,7 p.100 dans celle éluée à pH 4,5 ce qui correspond respectivement à 8 et 7

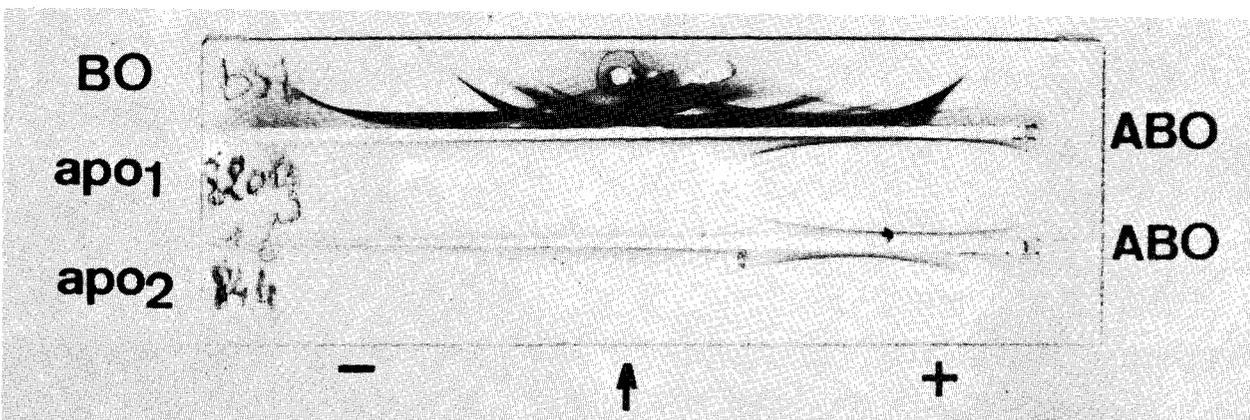
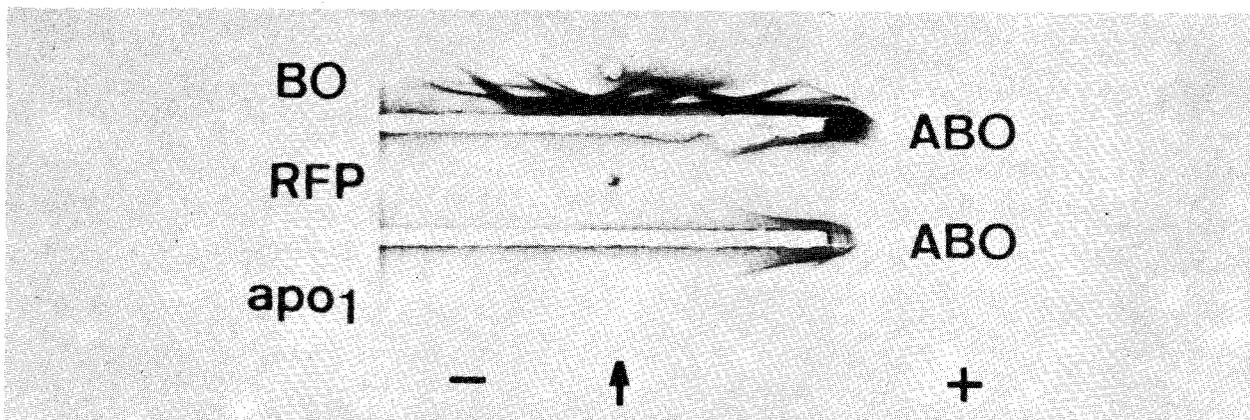
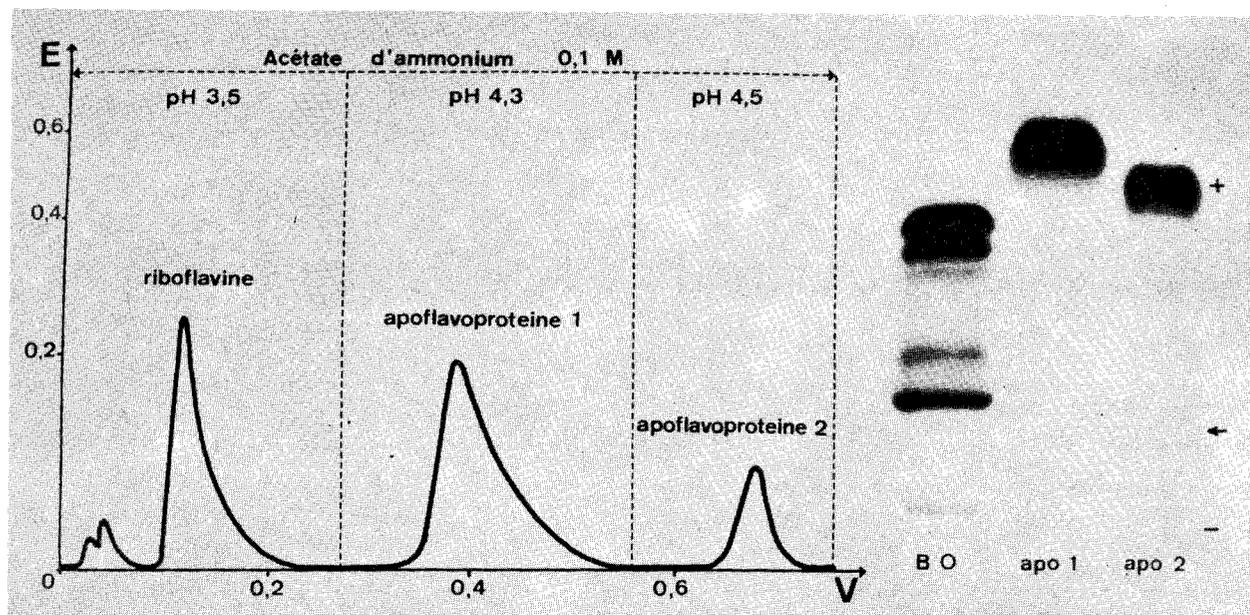


Figure 44

Préparation de l'apoflavoprotéine du blanc d'oeuf de Poule. Diagramme chromatographique du fractionnement de la riboflavoprotéine sur CM-cellulose ; électrophorèses et immuno-électrophorèses en tampon véronal (μ 0,07 : pH 8,65) des apoprotéines obtenues. BO : blanc d'oeuf ; RFP : riboflavoprotéine ; ABO : sérum anti-protéides du blanc d'oeuf.

groupes "phosphoryle" par molécule de masse moléculaire 32 000, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'il existerait dans le blanc d'oeuf deux apoflavoprotéines qui se distingueraient par un groupe "phosphorylé" comme c'est le cas pour les ovalbumines A₁, A₂ et A₃ (voir généralités, p.5). Toutefois ils précisent "than more samples need to be analysed to prove this definitely". Jusqu'à présent, aucune confirmation n'a été apportée à ces premiers résultats.

Nos recherches nous incitent à penser que l'apoflavoprotéine comme la riboflavoprotéine sont hétérogènes certes, mais, que l'hétérogénéité qui apparaît à la suite du fractionnement sur CM-cellulose, qui est peut-être la même que celle qu'ont observée RHODES et al. serait plutôt le résultat d'une légère dénaturation des composants de la riboflavoprotéine.

III - CONCLUSIONS GENERALES RELATIVES AUX METHODES DE PREPARATION DE LA RIBOFLAVOPROTEINE ET DE L'APO-FLAVOPROTEINE.

1 - Le procédé de RHODES, BENNETT et FEENEY de chromatographie du blanc d'oeuf de Poule sur DEAE-cellulose avec un gradient discontinu de pH et de concentration en NaCl fournit de la riboflavoprotéine impure à raison de 925 mg par litre de blanc d'oeuf. L'emploi subséquent de la DEAE-cellulose avec un gradient discontinu de concentration en NaCl dans un tampon phosphate de pH 8 permet de purifier les préparations précédentes et donne 750 mg de riboflavoprotéine homogène en immuno-électrophorèse. Les rendements des deux chromatographies successives étant de 90 p.100 environ, nous pouvons fixer la teneur du blanc d'oeuf en flavoprotéine à 0,9g par litre soit 0,9 p.100 environ des protéides totaux du blanc d'oeuf. Cette valeur est conforme aux déterminations de RHODES et al. (453).

2 - Le procédé de RHODES et al. de préparation de l'apoflavoprotéine nous a conduit à des résultats chromatographiques comparables à ceux de ces auteurs, en fournissant toutefois deux apoprotéines en proportions relatives très différentes. Les anomalies de comportement électrophorétique et immuno-électrophorétique du composant mineur laisse à penser que la CM-cellulose provoque une légère dénaturation des protéides.

3 - L'ensemble de nos résultats nous a permis de confirmer ceux de BLUM et HARDING (454) relatifs au comportement électrophorétique de pré-albumine de la riboflavoprotéine et ceux de RHODES et al. (455) concernant un comportement identique de l'apoflavoprotéine.

4 - Les connaissances très fragmentaires que nous avions des propriétés physiques de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf et notre ignorance presque complète de sa composition chimique nous ont incité à explorer ces divers domaines.

2 - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA FLAVOPROTEINE DU BLANC D'OEUF.

I - INTRODUCTION.

Récemment, WEBER, ZAK et OSTROWSKI (456) et OSTROWSKI, ZAK et KRAWCZYK (457) ont étudié les principales propriétés physico-chimiques de la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf et en ont défini la nature glycoprotéinique.

Ces mêmes auteurs ont démontré que "les flavoprotéides isolés à partir du jaune d'oeuf et du blanc d'oeuf étaient immunologiquement indiscernables". Dans le but de vérifier si cette analogie immunologique s'accompagne d'une analogie de composition et de structure, nous exposerons nos résultats personnels concernant les propriétés de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf en les comparant à celles (d'après les auteurs ci-dessus) de la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf.

Pour les raisons que nous avons exposées plus haut, nos recherches sur l'apoflavoprotéine n'ont porté que sur l'apoprotéine 1.

II - PROPRIETES PHYSIQUES.

A - MASSE MOLECULAIRE.

1° - METHODES.

Nous avons appliqué, d'une part, les procédés physiques classiques fondés essentiellement sur les données de l'ultracentrifugation et, d'autre

part des procédés chimiques fondés sur la connaissance de la composition en riboflavine (voir p. 184) et en acide sialique (voir p. 167).

2° - RESULTATS.

a - Ultracentrifugation.

La figure 45 (p.153) montre que la riboflavoprotéine est homogène en ultracentrifugation.

La constante de sédimentation S_{20W}^0 est égale à 2,96, la constante de diffusion à 7,54 et le volume spécifique partiel à 0,7. Le tableau XIX (p.154) montre que notre valeur de la constante de sédimentation diffère de celle obtenue par RHODES et al. (458) et de celle de la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf. Ce résultat que nous avons obtenu en 1968 se rapproche beaucoup du S_{20W}^0 3,0 récemment mesuré par FARRELL, MALLETT, BUSS et CLAGETT (459).

En ce qui concerne la constante de sédimentation, les résultats de RHODES et al. et les nôtres demeurent en désaccord ; notre valeur se rapproche cependant de celle obtenue par OSTROWSKI et al. pour la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf. Enfin, l'unanimité s'est faite sur la valeur du volume spécifique partiel.

Les quelques divergences que nous venons de signaler se traduisent par des valeurs de masse moléculaire discordantes. En appliquant la formule de SVEDBERG, nous avons calculé une masse moléculaire de 32 600 qui se distingue de celle de 36 000 obtenue par RHODES et al. (460) et par OSTROWSKI et al. (461) respectivement pour les riboflavoprotéines du blanc et du jaune d'oeuf. Il faut cependant signaler que des déterminations à l'équilibre de sédimentation, effectuées récemment par FARRELL, MALLETT, BUSS et CLAGETT (462) ont conduit ces auteurs à proposer pour la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf une masse moléculaire de 32 000.

b - Méthodes chimiques.

Des valeurs de 32 000 et 31 300 ont également été trouvées respectivement par RHODES et al. (463) et par nous même sur la base de la composition en riboflavine de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf qui peut fixer une molécule de riboflavine (P.M. = 376). Par ce même procédé, OSTROWSKI et al. (464) ont confirmé la valeur de 36 000 pour la masse moléculaire de la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf. Enfin, la teneur en acide sialique conduit à une valeur de 32 300.

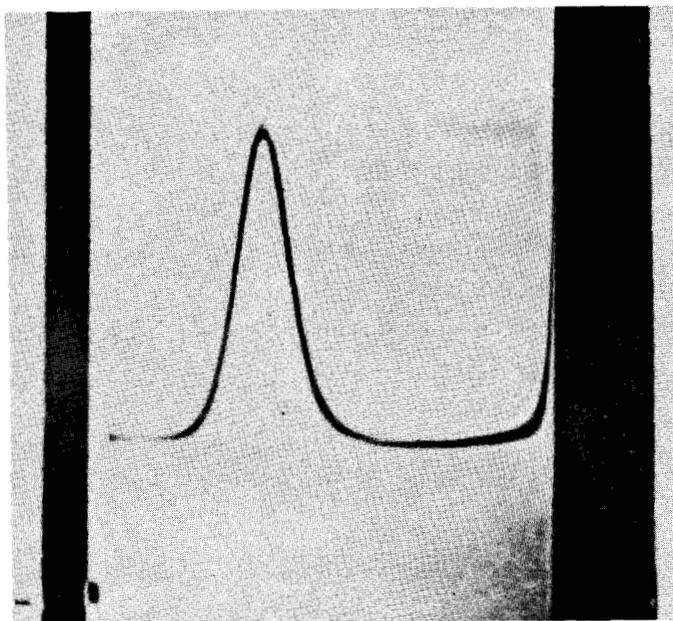


Figure 45

Diagramme d'ultracentrifugation de la riboflavoprotéine. Tampon phosphate 0,1 M de μ 0,1 et de pH 7 ; température 20° C ; inclinaison de la barre 60° ; concentration : 15 mg/ml. Cliché photographique pris après 90 mn de centrifugation.

Tableau XIX

Constantes de sédimentation et de diffusion, volume spécifique partiel et masse moléculaire des riboflavoprotéines du blanc et du jaune d'oeuf de Poule.

	Riboflavoprotéine du blanc d'oeuf		Riboflavoprotéine du jaune d'oeuf
	Résultats personnels	Résultats de RHODES <u>et al.</u> (465)	OSTROWSKI <u>et al.</u> (466)
Constante de sédimentation S_{20}°	2,96	2,76	3,16
Constante de diffusion D_{20}°	7,54	6,4	7,45
Volume spécifique partiel	0,7	0,7	0,699
<u>Masse moléculaire</u>			
Méthode de SVEDBERG	32 600	36 000	36 000
Teneur en riboflavine	31 300(a)	32 000(b)	36 000(c)
Teneur en acide sialique	32 300(d)	-	-

- (a) Pour 1 résidu et 1,20 p.100 de riboflavine.
 (b) Pour 1 résidu et 1,47 p.100 de riboflavine.
 (c) Pour 1 résidu et 1,04 p.100 de riboflavine.
 (d) Pour 1 résidu et 0,9 p.100 d'acide sialique.

3° - CONCLUSIONS.

Sur la base des résultats reproductibles obtenus par l'application de différents procédés d'ordre physique et d'ordre chimique par les auteurs et par nous même, nous proposons la valeur moyenne de 32 000 pour la masse moléculaire de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf.

B - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE.

Nous avons étudié, la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine en électrophorèse de zone sur acétate de cellulose. D'après OSTROWSKI, ZAK et KRAWCZYK (467), la vitesse électrophorétique de la flavoprotéine du jaune d'oeuf n'est pas affectée par la fixation de la riboflavine. Afin de vérifier s'il en est de même pour la flavoprotéine du blanc d'oeuf, nous avons étudié le comportement électrophorétique de la riboflavoprotéine et de l'apoflavoprotéine après saturation par la riboflavine.

Nous avons, en outre, étudié la riboflavoprotéine en électrofocalisation dans le but de déterminer son point isoélectrique.

1° - METHODES.

-a- L'électrophorèse de zone sur acétate de cellulose a été faite sur des feuilles de Cellogel dans les conditions suivantes :

- Tampon véronal : $\mu = 0,07$; pH 8,65 ; 10 V/cm ; 2h30.
- Acétate d'ammonium 0,05 M ; pH 4,45 ; 11 V/cm ; 2h.

Les analyses quantitatives densitométriques par transmittance, des électrophorégrammes ont été effectuées à l'aide d'un photomètre intégrateur, enregistreur.

-b- L'électrofocalisation. 50 mg de protéide ont été analysés dans des solutions d'ampholytes qui permettent de réaliser des gradients de pH entre 3 et 6. L'anode a été placée à la partie supérieure de la colonne et la cathode à la partie inférieure. La migration s'effectue de l'anode vers la cathode. Les autres conditions d'expérience sont identiques à celles décrites précédemment (voir p. 68).

-c- La saturation en riboflavine de la riboflavoprotéine et de l'apoflavoprotéine. Les protéides sont dissous dans une solution de riboflavine en excès dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 7 et la saturation est déterminée sur la base de la connaissance de la capacité de fixation de la

riboflavine par les protéides. (voir page 184). Des solutions à 5 p.100 ont été soumises à l'analyse électrophorétique dans les conditions résumées ci-dessus ; la riboflavine libre ne migre pas.

2° - RESULTATS.

-a- Electrophorèse de zone sur acétate de cellulose.

-1- Hétérogénéité électrophorétique de la flavoprotéine.

Au cours de l'étude des méthodes de préparation, nous avons vu que la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine sont homogènes en électrophorèse avec le tampon véronal de pH 8,65 (voir Fig. 43 ; p.146 et Fig. 44 ; p.149). Il en va tout autrement avec le tampon acétate d'ammonium de pH 4,45. La figure 46 (p.157) montre en effet que les deux préparations sont hétérogènes. La riboflavoprotéine montre une trainée anodique et trois bandes R₁, R₂ et R₃ dont les vitesses anodiques sont croissantes et dont les proportions relatives sont égales respectivement à 50 p.100, 40 p.100 et 10 p.100 des protéides totaux. L'apoflavoprotéine présente une trainée anodique beaucoup plus courte et se dissocie en deux fractions seulement : A₁ et A₂. La fraction A₁ correspond à la bande R₁ de la riboflavoprotéine, tandis que la fraction A₂ possède une vitesse intermédiaire entre celles des bandes R₁ et R₂. Il semble donc que la CM-cellulose ait une activité légèrement dénaturante puisqu'elle provoque la diminution de la charge de surface du composant mineur R₃ de la riboflavoprotéine qui disparaît du diagramme électrophorétique de l'apoflavoprotéine.

-2- Influence de la riboflavine.

Les électrophorèses effectuées avec le tampon véronal de pH 8,65 ne révèlent aucune différence de comportement entre les protéides avant et après saturation en riboflavine (Fig. 46 ; p.157). Au contraire avec le tampon acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, les électrophorèses représentées à la figure 46 (p.157) permettent les remarques suivantes :

α- L'apoflavoprotéine saturée en riboflavine conserve son hétérogénéité mais possède une vitesse anodique plus grande que l'apoprotéine. La fraction A₂ correspond maintenant à la bande R₂ de la riboflavoprotéine.

β - La riboflavoprotéine saturée en riboflavine montre une image semblable à celle de l'apoflavoprotéine saturée mais diffère de la riboflavoprotéine native. La bande R₁ de cette dernière qui a vu sa vitesse augmentée correspond à la bande A₁ de l'apoflavoprotéine saturée. Quant aux bandes R₂ et R₃, leur vitesse n'a pas varié.

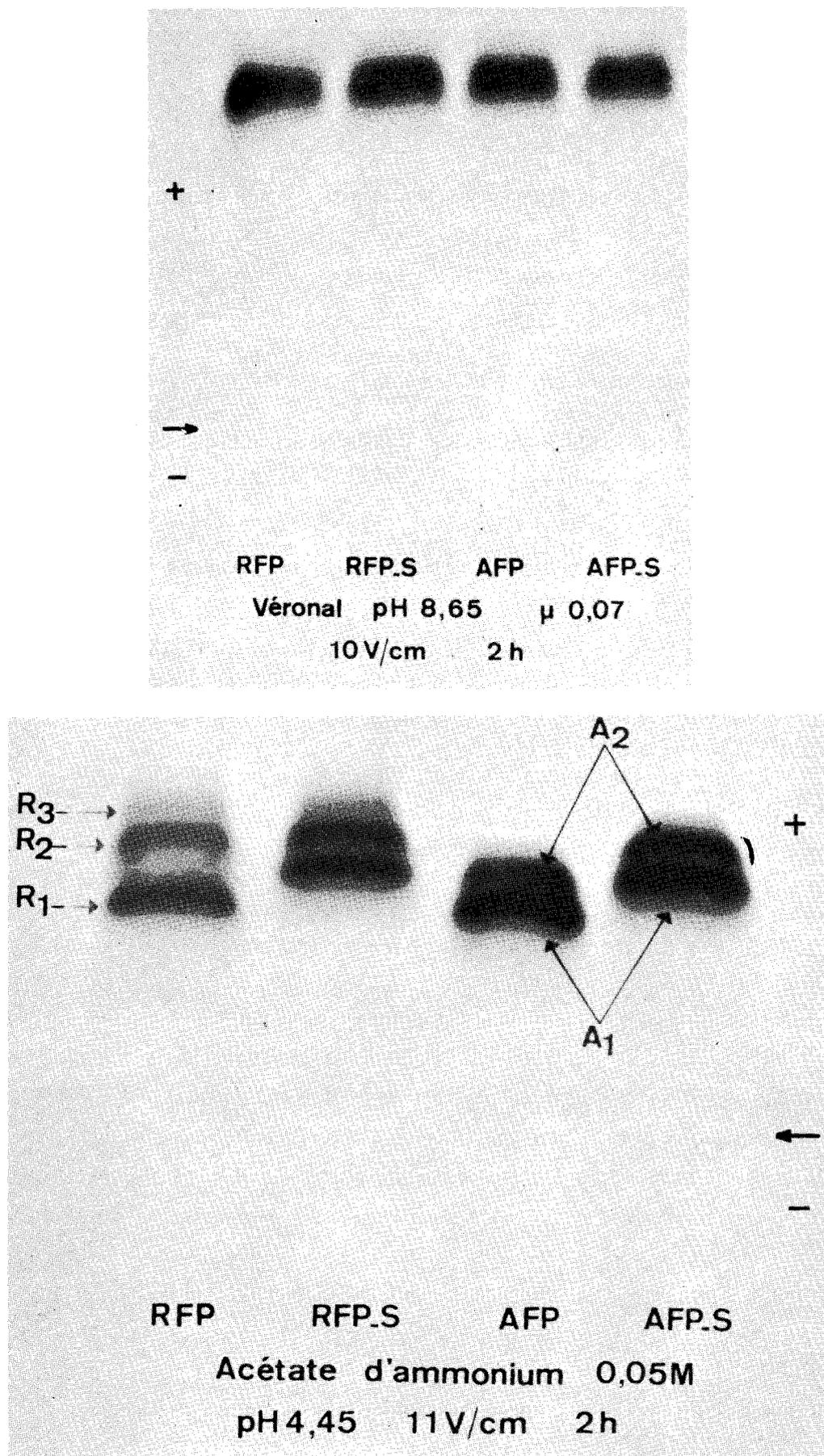


Figure 46

Electrophorèses sur acétate de cellulose en tampons véronal et acétate d'ammonium de la riboflavoprotéine native (RFP) et saturée en riboflavine (RFP-S), de l'apoflavoprotéine (AFP) et de l'apoflavoprotéine saturée en riboflavine (AFP-S).

On peut donc admettre que la riboflavoprotéine n'est pas saturée en riboflavine mais qu'elle est au contraire formée de plusieurs espèces moléculaires : l'une, correspondant à la bande R₁ existe sous la forme d'apoprotéine, les autres qui correspondent aux bandes R₂ et R₃ étant combinées à la riboflavine. Ce résultat est en accord avec les dosages effectués par RHODES et al. (468). En se basant sur la teneur en riboflavine du blanc d'oeuf et sa capacité de fixation de la riboflavine (dans le blanc d'oeuf, seul le système riboflavoprotéine - apoflavoprotéine est capable de se combiner à la riboflavine), ces auteurs ont estimé, en effet, que le blanc d'oeuf contient un mélange de riboflavoprotéine et d'apoflavoprotéine en quantités approximativement égales.

Même en milieu acide la charge globale de la riboflavoprotéine et des deux apoprotéines est négative et toutes les trois migrent vers l'anode. Ce comportement est conforme à leur teneur élevée en acides glutamique et aspartique (voir page 175). Lorsque l'apoprotéine se combine à la riboflavine, sa vitesse anodique augmente encore. Ce résultat confirme les conclusions tirées par ZAK, WEBER et OSTROWSKI (469) de l'étude des courbes de titration potentiométrique de la riboflavoprotéine et de l'apoprotéine du jaune d'oeuf, d'après lesquelles, en plus du groupe phénolique des résidus de tyrosine et des groupes carboxyliques, le groupe ε-aminé des résidus de lysine pourrait être impliqué dans la liaison riboflavine - apoprotéine.

-b- Electrofocalisation.

Le diagramme d'élution d'une colonne d'électrofocalisation est représenté à la figure 47 (p.159). Il confirme l'hétérogénéité électrophorétique de la riboflavoprotéine. La mesure du pH au sommet des pics nous a permis de fixer les points isoélectriques des fractions R₁, R₂ et R₃ respectivement à 3,95 ; 3,85 et 3,70.

3° - CONCLUSIONS.

-a- La riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine du blanc d'oeuf possèdent la même vitesse anodique et sont homogènes en électrophorèse sur acétate de cellulose dans le tampon véronal de pH 8,65. ZAK et al. (470), en utilisant le gel de polyacrylamide avec un tampon Tris-glycocolle de pH 8,3 et des feuilles d'acétate de cellulose avec un tampon Tris-phosphate-acide citrique de pH 8,4, ont abouti à la même conclusion pour la riboflavoprotéine et l'apoprotéine du jaune d'oeuf.

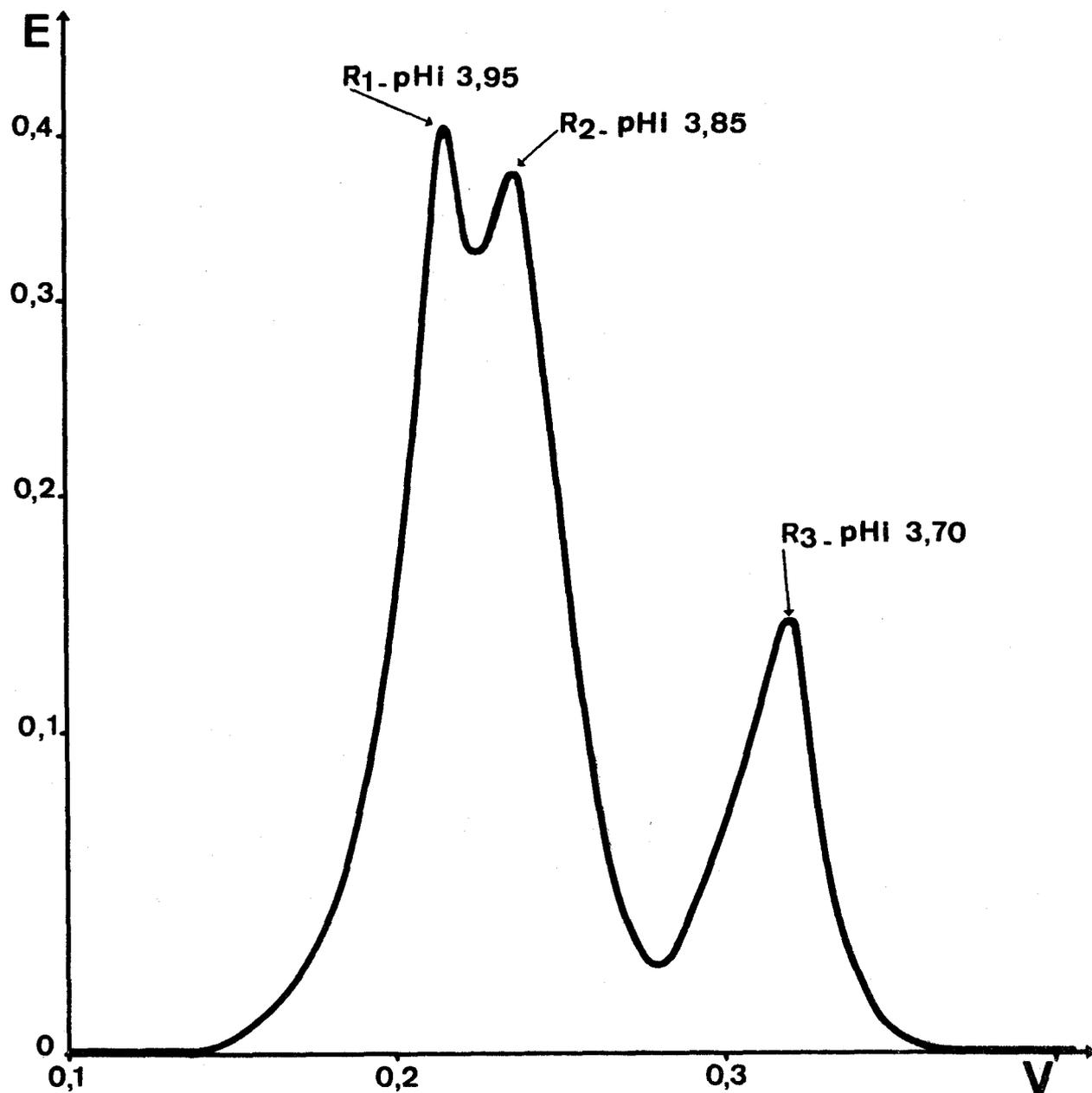


Figure 47

Electrofocalisation dans une solution d'ampholytes (gradient de pH entre 3 et 6) de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf de poule.

V : volumes des effluents exprimés en litre .

E : densité optique à 280 nm.

-b- Sur le même support d'électrophorèse mais avec un tampon acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine du blanc d'oeuf se révèlent hétérogènes et on peut caractériser trois composants dans la riboflavoprotéine et deux composants dans l'apoflavoprotéine ; celui dont la vitesse anodique est la plus faible est commun à la riboflavoprotéine et à l'apoprotéine tandis que les autres possèdent des comportements différents.

L'électrofocalisation confirme cette hétérogénéité et permet de fixer à 3,95 ; 3,85 et 3,70 les points isoélectriques des trois composants de la riboflavoprotéine.

La différence de comportement électrophorétique entre la riboflavoprotéine et l'apoprotéine n'apparaît pas en milieu alcalin et nous ne pouvons pas comparer nos résultats à ceux de ZAK et al. qui n'ont pas utilisé de tampons acides et qui, dans ces conditions, n'ont constaté aucun changement significatif de la charge électrique de surface lorsque la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf est débarrassée de la riboflavine.

-c- Saturées en riboflavine, la riboflavoprotéine et l'apoprotéine du blanc d'oeuf possèdent, même en milieu acide des comportements électrophorétiques identiques. La riboflavoprotéine native, comme celle du jaune d'oeuf d'ailleurs, n'est pas saturée en riboflavine ; la fraction la moins anodique existe sous la forme d'apoprotéine et représente environ 50 p.100 des protéides. L'augmentation de la vitesse anodique des protéides saturés en riboflavine est en faveur de l'implication du groupement ϵ -aminé des acides aminés basiques comme la lysine dans la liaison riboflavine-protéine.

C - PROPRIETES OPTIQUES.

1° - ABSORPTION DE LA LUMIERE.

-a- Méthodes.

Les courbes d'absorption de la lumière visible ont été déterminées en cuves de 1 cm d'épaisseur avec des solutions à 0,5 p.100 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7, de riboflavoprotéine, d'apoflavoprotéine et d'apoflavoprotéine saturée en riboflavine. Pour les mesures dans l'ultra-violet nous avons utilisé des solutions à 0,05 p.100 ml d'eau ajustées à pH 7, des mêmes protéides.

La saturation en riboflavine a été déterminée sur la base de la capacité de fixation de la riboflavine par l'apoflavoprotéine telle qu'elle est définie à la page 184. Après élimination par dialyse du léger excès de riboflavine, les protéides saturés ont été lyophilisés puis analysés.

Les coefficients d'extinction $\epsilon \frac{1}{1 \text{ cm}} \frac{\text{p.100}}{\text{cm}}$ ont été calculés d'après les valeurs obtenues aux divers maxima d'absorption.

-b- Résultats.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XX (p.162). Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

-1- Sauf l'apoflavoprotéine qui n'absorbe évidemment pas les radiations de la lumière visible, la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine saturée en riboflavine présentent deux maxima d'absorption : l'un à 375 nm, l'autre à 458 nm. Cette propriété est commune aux flavoprotéides du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf, et les résultats obtenus par les auteurs s'accordent à l'exception de la longueur d'onde de l'un des maxima pour laquelle RHODES et al. ont trouvé une valeur de 455, légèrement inférieure à celles de OSTROWSKI et al. et à la nôtre de 458 nm. Les coefficients d'extinction que les auteurs précédents n'ont pas précisés sont plus importants à 458 nm qu'à 375 nm et sont aux deux longueurs d'onde, plus faibles pour la riboflavoprotéine que pour l'apoflavoprotéine saturée.

-2- Dans l'ultra-violet, l'apoflavoprotéine, la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine saturée en riboflavine ne montrent qu'un seul pic respectivement à des longueurs d'onde de 280 nm, 277 nm et 275 nm, auxquelles correspondent des coefficients d'extinction de 15, 18 et 20,4.

-3- Le rapport entre le coefficient d'extinction à 280 nm et celui à 458 nm est égal à 6,41. Cette valeur peut être confondue avec celle de 6,5 trouvée par OSTROWSKI et al. pour le flavoprotéide du jaune d'oeuf.

2° - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE.

-a- Méthodes.

Nous avons étudié le pouvoir rotatoire spécifique à 546 nm, de solutions d'apoflavoprotéine, de riboflavoprotéine native et d'apoflavoprotéine saturée en riboflavine. La saturation a été obtenue par addition de riboflavine aux solutions d'apoflavoprotéine, juste avant les mesures, sans qu'il ait été nécessaire d'éliminer la riboflavine en excès ; les solutions aqueuses neutres de cette dernière possèdent en effet un pouvoir rotatoire négligeable. Les déterminations ont été effectuées sur des solutions à 1 g de protéide pour 100 ml d'eau, ajustées à pH 7.

Tableau XX

Propriétés optiques de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf de Poule.

Nature des protéides	max. dans le visible (a)			max. dans l'ultra-violet (a)			ϵ^{-1} p. 100 (b)	ϵ^{-1} p. 100 375 nm	ϵ^{-1} p. 100 458 nm	ϵ^{-1} p. 100 546 nm (c)
	1	2	3	1	2	3				
Apoflavoprotéine	-	-	-	280	280	280	15	-	-	- 71°, 2
Riboflavoprotéine	375	375	375	277	276	-	18	1,27	1,75	- 55°, 4
Apoflavoprotéine saturée en riboflavine.	458	455	458	275	-	276	20,4	2,28	3,18	- 38°, 5

(a) : en nm.

(b) : à 280 nm pour l'apoflavoprotéine ; à 277 nm pour la riboflavoprotéine ; à 275 nm pour l'apoflavoprotéine saturée en riboflavine.

(c) : dans l'eau et à pH 7.

1 : Résultats personnels.

2 : Résultats de RHODES et al. (471) avec la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf.

3 : Résultats de OSTROWSKI et al. (472) avec la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf.

-b- Résultats.

L'examen du Tableau XX (p.162) montre que l'apoflavoprotéine est plus lévogyre que la riboflavoprotéine, qui est elle même plus lévogyre que l'apoflavoprotéine saturée en riboflavine. Ce résultat implique d'une part, que la riboflavoprotéine native n'est pas saturée en riboflavine et d'autre part que la fixation du noyau de l'isocalloxazone se traduit par une modification de la structure conformationnelle de la molécule et que la riboflavine intervient dans la structure tertiaire des flavoprotéines.

3° - CONCLUSIONS.

-a- Comme d'autres flavoprotéines, et comme celle du jaune d'oeuf dont elle possède les mêmes propriétés en spectrophotométrie d'absorption, la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf provoque un déplacement des bandes d'absorption de la riboflavine de 373 nm et 445 nm vers des longueurs d'onde plus longues.

-b- La riboflavine participe à l'élaboration de la structure tertiaire de la flavoprotéine et l'apoflavoprotéine peut donc être considérée comme une structure transconformationnelle, ainsi qu'en témoigne l'augmentation de la lévoration quand la riboflavine est détachée de la riboflavoprotéine.

-c- La valeur plus forte du coefficient d'extinction et la valeur plus faible du pouvoir rotatoire spécifique de l'apoflavoprotéine saturée en riboflavine, par rapport à la valeur des mêmes paramètres de la riboflavoprotéine native, confirme que cette dernière n'est pas saturée en riboflavine.

D - CONCLUSIONS GÉNÉRALES CONCERNANT LES PROPRIÉTÉS
PHYSIQUES DE LA FLAVOPROTEINE DU BLANC D'OEUF.

De l'étude des propriétés physiques de la flavoprotéine du blanc d'oeuf nous pouvons dégager les conclusions suivantes :

1° - La masse moléculaire de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf est égale à 32 000. Elle se distingue donc de celle de la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf qui a été fixée à 36 000 par OSTROWSKI et al.

2° - La riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine sont homogènes en électrophorèse de zone en milieu alcalin, et, dans ces conditions, possèdent des comportements identiques. En milieu acide au contraire, elles sont hétérogènes et se distinguent facilement l'une de l'autre ; saturées en riboflavine, elles montrent alors des diagrammes électrophorétiques comparables. La fraction électrophorétique la moins anodique est commune aux deux préparations : elle représente 50 p.100 environ des protéides totaux de la riboflavoprotéine native et s'y trouve sous la forme d'apoflavoprotéine.

OSTROWSKI, ZAK et KRAWCZYK (473) et ZAK, WEBER et OSTROWSKI (474) n'ont observé aucun de ces phénomènes avec la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf, mais, la comparaison de nos résultats aux leurs est mal aisée, ces auteurs n'ayant pas étudié le comportement électrophorétique de leurs préparations, en milieu acide.

3° - La riboflavoprotéine du blanc d'oeuf possède les propriétés optiques générales des flavoprotéines, et de ce point de vue, ne se distingue donc pas de la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf.

En spectrophotométrie directe, elle déplace les bandes d'absorption de la riboflavine de 373 nm et 445 nm vers des longueurs d'onde plus longues. Les coefficients d'extinction de la riboflavoprotéine native, dans la lumière visible aussi bien que dans l'ultra-violet, sont intermédiaires entre ceux de l'apoflavoprotéine et ceux des flavoprotéides saturés en riboflavine. Ces résultats confirment l'insaturation de la riboflavoprotéine native.

La spectropolarimétrie conduit aux mêmes conclusions. L'augmentation de plus de 50 p.100 de la lévrotation quand la riboflavine est détachée de la riboflavoprotéine implique que le noyau de l'isoalloxazine participe à un haut degré à la structure conformationnelle de la protéine.

4° - De l'ensemble de ces conclusions, il découle que les différences les plus marquantes entre les propriétés physiques des riboflavoprotéines du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf se rattachent à des éléments de la composition chimique ; c'est dire que cette dissemblance va s'affirmer dans le paragraphe suivant dans lequel nous allons maintenant exposer les résultats de nos recherches sur la composition chimique des flavoprotéides du blanc d'oeuf.

III - PROPRIETES CHIMIQUES.

Nous envisagerons successivement la composition de la fraction glycanique, l'étude de la fraction protidique, la composition en phosphore et la détermination de la capacité de fixation de la riboflavine.

A - COMPOSITION DE LA FRACTION GLYCANNIQUE.

1° - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES.

-a- Méthodes appliquées.

-1- Les oses "neutres" ont été dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (475) modifiée par RIMINGTON (476). Les solutions de référence à 200 µg d'oses totaux p. 1 ml contenaient du galactose et du mannose dans les proportions 1:3,5.

-2- Les osamines ont été déterminées par la méthode colorimétrique d'ELSON et MORGAN (477), modifiée par BELCHER et coll. (478). Elles ont été préalablement libérées par une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N ; 100°C ; 4h).

-3- Les acides sialiques ont été dosés par les procédés colorimétriques à la diphénylamine de WERNER et ODIN (479) et à l'acide périodique-acide thiobarbiturique d'AMINOFF (480). Cette dernière méthode qui nécessite la libération préalable des acides sialiques a été appliquée après hydrolyse enzymatique des liaisons sialosyls. Nous avons utilisé la neuraminidase* (3.2.1.18) extraite de Clostridium perfringens selon le protocole expérimental suivant : 5mg de protéide sont dissous dans 0,5 ml de tampon acétate de sodium 0,2 M de pH 5. A 0,4 ml de cette solution on ajoute 0,4 ml de tampon acétate et 0,2 ml d'une solution d'enzyme contenant 4 unités de Neuraminidase**. Dans une autre série d'expériences, les protéides ont été traités par des quantités d'enzyme 100 fois plus faibles. Les solutions sont incubées dans un bain-marie à 37°C pendant des temps variant de 0 à 24h, puis additionnées d'un ml d'acide phosphotungstique à 5 p.100 et centrifugées. Les acides sialiques libérés sont dosés sur 0,5 ml de ces solutions.

* : Fournisseur : SIGMA CHEMICAL COMPAGNY - Type VI - N 3001.

** : Une unité de neuraminidase libère une nanomole d'acide N-acétylneuraminique par minute , à 37°C, de la mucine submaxillaire bovine.

Nota : On vérifie au préalable que les préparations de neuraminidase sont exemptes de neuraminyl-aldolase (N-acétylneuraminatase lyase 4.1.3.3.) en appliquant le procédé de GIBBONS (481) fondé sur la recherche et le dosage de la N-acétylmannosamine libérée.

-b- Résultats.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XXI (p.167). Les valeurs présentées sont les moyennes de plusieurs séries de dosages effectués sur 10 échantillons différents de flavoprotéide. A titre de comparaison nous avons indiqué la composition du flavoprotéide du jaune d'oeuf, déterminée par OSTROWSKI et al. (482).

Les compositions en glucides des flavoprotéides du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf sont très différentes. La valeur du rapport oses "neutres" / osamines est particulièrement démonstrative à cet égard : elle est chez l'un, l'inverse de ce qu'elle vaut chez l'autre.

La teneur en acide sialique établit un autre caractère distinctif : nulle dans la flavoprotéine du jaune d'oeuf, elle est égale à 0,9 p.100 dans la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf, aussi bien avec la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN qu'avec le procédé à l'acide thiobarbiturique d'AMINOFF après hydrolyse par la neuraminidase. Cette dernière libère la totalité des acides sialiques après 2 heures d'incubation dans les conditions expérimentales employées, avec les proportions enzyme - substrat : 4 U* - 4 mg. Quand le rapport enzyme / substrat est faible, (0,04 U* d'enzyme pour 4 mg de substrat), 0,37 p.100 seulement d'acide sialique est libéré après 24h. d'incubation à 37°C du mélange en réaction. Sans addition d'acide phosphotungstique qui inhiberait l'activité de l'enzyme, après 4 jours de dialyse à 5°C contre le tampon acétate, puis dialyse contre l'eau distillée et lyophilisation, un indosé de 0,50 p.100 d'acide sialique a pu être déterminé par la méthode à la diphénylamine.

Il faut remarquer enfin, que l'apoflavoprotéine, contient un peu moins d'acide sialique que la riboflavoprotéine native. Ce résultat peut être rapproché des observations que nous avons faites dans notre étude électrophorétique. Il confirmerait l'action dénaturante de la CM-cellulose dont une légère activité sialidasique pourrait expliquer l'absence dans l'apoflavoprotéine, de la fraction électrophorétique R₃, la plus anodique de la riboflavoprotéine (voir figure 46 ; p.157).

Afin de vérifier si l'acide N-acétylneuraminique fait bien partie intégrante des flavoprotéines du blanc d'oeuf nous avons étudié leur comportement électrophorétique après hydrolyse par la neuraminidase.

* : U = unités.

Tableau XXI

Compositions centésimale et molaire* en glucides de la flavo-protéine du blanc d'oeuf et de la flavoprotéine du jaune d'oeuf.

	Flavoprotéine du blanc d'oeuf Résultats personnels	Flavoprotéine du jaune d'oeuf Résultats de OSTROWSKI et al. (483)
<u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>		
Oses "neutres"	4,83	7,79
Osamines	8,70	3,99
Acide sialique		
Méthode à la diphénylamine	0,90 (0,70***)	0
Méthode à l'acide thiobarbiturique**	0,88 (0,67***)	
Oses "neutres"/Osamines	0,55	1,95
<u>COMPOSITION MOLLAIRE</u>		
Galactose	2	5,1
Glucose	0	3,2
Mannose	7	5,9
Fucose	0	1,2
N-acétylglucosamine	14	6
Acide N-acétylneuraminique	1	0,32 à 0,50 ?
Mannose / Galactose	3,5	1,15

* Pour des masses moléculaires de 32 000 pour la flavoprotéine du blanc d'oeuf et de 36 000 pour la flavoprotéine du jaune d'oeuf.

** Après hydrolyse par la neuraminidase suivant les conditions expérimentales décrites à la page 165 (4 mg de protéide pour 4 unités d'enzyme.)

*** Dans l'apoflavoprotéine.

2° - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES HYDROLYSATS NEURAMINIDASQUES DE LA RIBOFLAVOPROTEINE ET DE L'APOFLAVOPROTEINE.

-a- Méthode appliquée.

Quatre mg de protéide sont dissous dans 0,1 ml de tampon acétate de sodium 0,2 M ajusté à pH 5 et contenant 4 unités ou 0,04 unité de neuraminidase. Les solutions sont incubées dans un bain-marie à 37°C pendant 15h puis soumises à l'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose.

-b- Résultats et discussion.

Que ce soit avec le tampon véronal de pH 8,65 ou avec la solution d'acétate d'ammonium de pH 4,45, les électrophorèses de la figure 48 a (p.169), révèlent que l'hydrolyse par la neuraminidase confère à la riboflavoprotéine et à l'apoflavoprotéine des comportements identiques et moins anodiques en annulant totalement leur hétérogénéité. La flavoprotéine du blanc d'oeuf contient donc bien de l'acide sialique, ce dernier participe pour une part importante au comportement anodique et doit être impliqué dans les différences de mobilité des protéides qui composent la flavoprotéine. Le fait que cette dégradation peut s'observer aussi bien sur les électrophorèses effectuées avec un tampon alcalin qu'avec un tampon acide, nous permet d'établir sans ambiguïté une distinction nette entre les flavoprotéines du blanc et du jaune d'oeuf. Cette dernière, en effet, selon ZAK et al. ne contient pas d'acide sialique et l'hydrolyse par la neuraminidase ne provoque aucun changement de la mobilité électrophorétique. Toutefois, la figure 48 b (p.169) montre que l'emploi de concentrations faibles en enzyme (qui ne libèrent qu'une partie des acides sialiques des flavoprotéides du blanc d'oeuf, comme nous l'avons vu précédemment) ne se traduit par aucun changement de la vitesse des protéides en électrophorèse avec le tampon véronal de pH 8,65 et qu'elle ne modifie que légèrement la vitesse des bandes les plus anodiques, en électrophorèse avec le tampon acétate de pH 4,45. Il n'est pas impossible que les auteurs précédents se soient trouvés dans un cas analogue en conduisant leur hydrolyse à 5°C. Nous reviendrons sur cette question dans la discussion des résultats concernant la composition molaire en acide sialique des flavoprotéides de l'oeuf.

3° - COMPOSITION MOLLAIRE EN GLUCIDES.

-a- Identification des oses constituant le groupement glycanique.

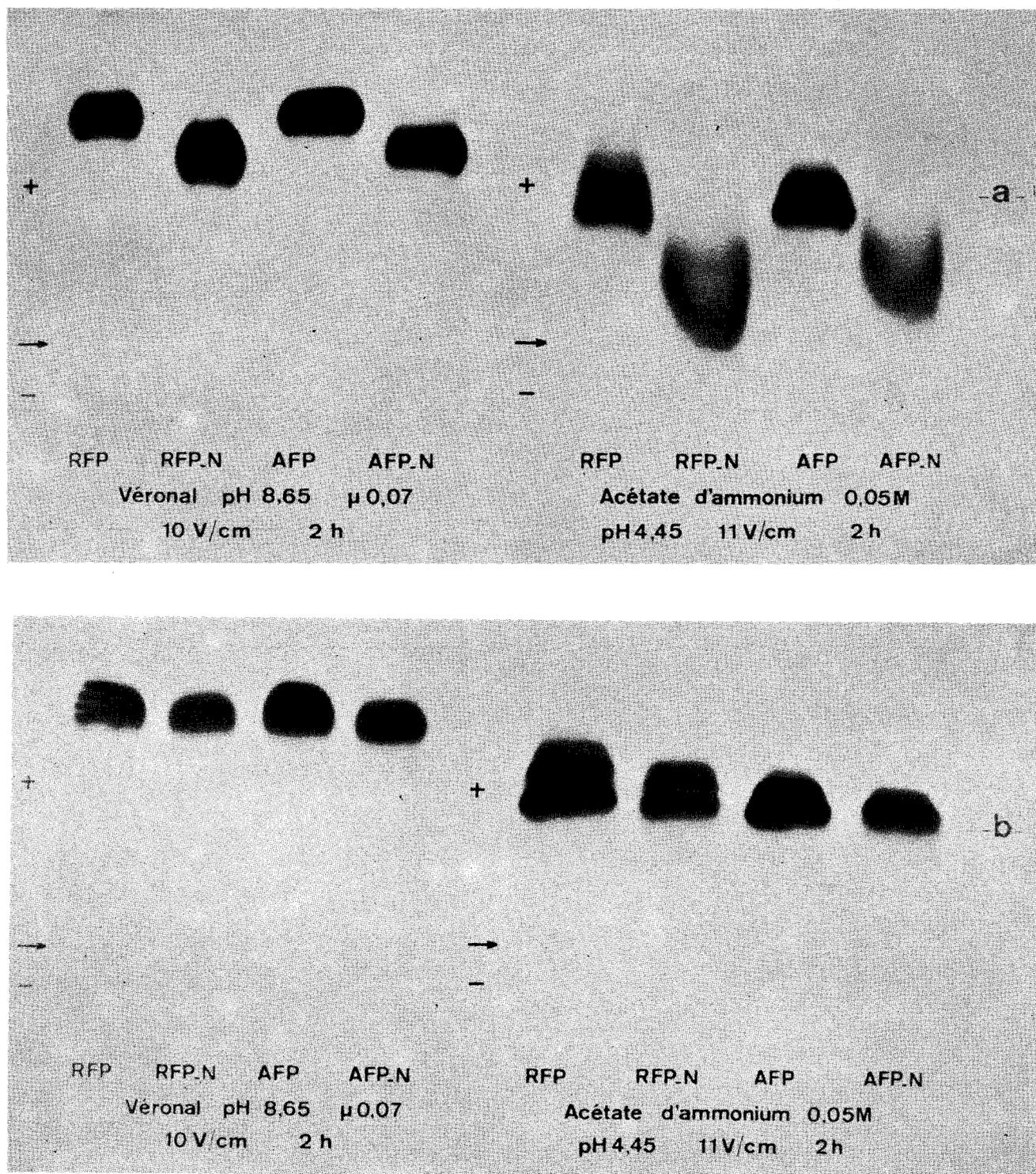


Figure 48

Electrophorèses sur acétate de cellulose en tampon véronal et en tampon acétate d'ammonium de la riboflavoprotéine (RFP), de l'apoflavoprotéine (AFP) et des deux protéides hydrolysés par la neuraminidase (RFP-N ; AFP-N).

-a- 4 unités d'enzyme pour 4 mg de protéide.

-b- 0,04 unité d'enzyme pour 4 mg de protéide.

-1- Les oses "neutres" ont été identifiés au galactose et au mannose par chromatographie sur papier dans les systèmes solvants :

- n-butanol / acide acétique / eau (4:1:5)
- pyridine / acétate d'éthyle / eau (1:2:2)

Le dosage chromatographique des oses "neutres" selon les procédés de DATE (484) modifié et de MONTREUIL (485) modifié, nous a permis de fixer le rapport molaire mannose / galactose à 3,5.

-2- La figure 49 (p.171) montre que l'électrophorèse en tampon borate de l'osamine N-réacétylée selon le procédé de ROSEMAN et LUDOWIEG (486), permet de caractériser la présence de N-acétylglucosamine.

-3- Nous n'avons pas déterminé la nature de l'acide sialique. Toutefois, sa libération très rapide par hydrolyse neuraminidase (la libération des acides sialiques est totale au bout de 2 h d'incubation quand 4 mg de protéide sont traités par 4 unités d'enzyme) permet de supposer avec une grande probabilité, comme l'a montré SPIK (487) qu'il s'agit d'acide N-acétylneuraminique.

-b- Composition molaire en glucides de la riboflavoprotéine.

Sur la base de la connaissance de la composition centésimale en glucides et du rapport molaire mannose / galactose d'une part et d'une valeur de 32 000 de la masse moléculaire d'autre part, nous avons calculé le nombre de résidus des différents oses présents dans la riboflavoprotéine dont nous donnons la composition dans le Tableau XXI (p.167).

Les différences que nous avons relevées à propos de la composition centésimale en glucides entre les flavoprotéines du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf, s'affirment ici.

-1- Si la glucosamine est commune aux deux flavoprotéides, celui du blanc d'oeuf contient 8 résidus de plus que son homologue du jaune d'oeuf.

-2- Les deux protéides contiennent du galactose et du mannose mais en proportions et en nombres très différents. En outre, la flavoprotéine du jaune d'oeuf renferme du glucose et du fucose qui n'existent pas dans la flavoprotéine du blanc d'oeuf.

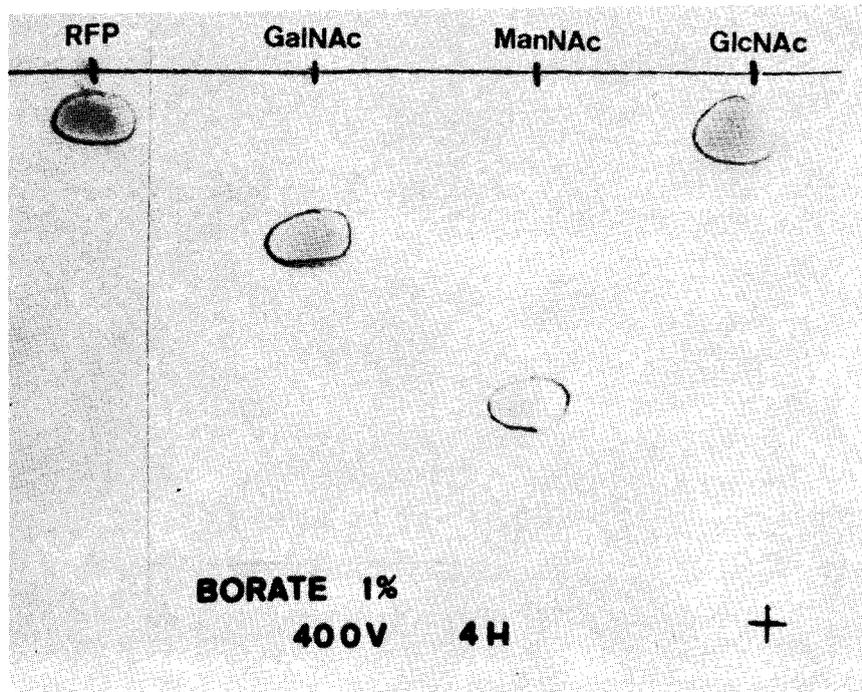


Figure 49

Comportement électrophorétique de la N-acétylosamine obtenue par N-réacétylation de l'osamine libérée par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N ; 100°C ; 4h) de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf (RFP). Electrophorèse effectuée en cuve "en toit" en tampon borate de pH 9,2 (solution de tétraborate de sodium à 1 g p.100 ml), à 10 V/cm, pendant 4h. Révélation par la réaction d'EHRlich "indirecte". T : solution témoin de N-acétylglucosamine (GlcNAc), de N-acétylgalactosamine (GalNAc) et de N-acétylmannosamine (ManNAc) pures.

-3- La riboflavoprotéine totale du blanc d'oeuf contient 1 résidu d'acide N-acétylneuraminique par mole de masse moléculaire 32 000. Toutefois, la suppression de l'hétérogénéité électrophorétique après la libération totale de l'acide sialique par hydrolyse neuraminidasique permet de supposer que le nombre de résidus n'est pas le même dans les différentes "espèces" moléculaires que nous avons caractérisées. L'isolement de ces dernières permettra de préciser ce point.

Que ce soit après hydrolyse sulfurique, trichloracétique ou neuraminidasique, OSTROWSKI et al. n'ont caractérisé qu'entre 0,32 et 0,50 mole d'acide sialique par mole de flavoprotéine du jaune d'oeuf. Ce résultat ambigu a conduit les auteurs à attribuer cette présence à une légère contamination de leurs préparations par d'autres protéides de l'oeuf, riches en acide sialique. Nos recherches sur la composition en acide sialique de la flavoprotéine du blanc d'oeuf nous permettent de proposer une autre interprétation plausible à ces résultats aberrants. Nous avons vu en effet, que la neuraminidase utilisée dans des conditions éloignées des conditions optimales d'activité, ne libère que 0,4 résidu d'acide sialique par mole de riboflavoprotéine et que cette libération déficitaire ne se traduit par aucun changement appréciable en électrophorèse dans des conditions expérimentales voisines de celles employées par OSTROWSKI et al. (voir la Figure 48 ; p.169). Ces auteurs, qui ont conduit l'hydrolyse neuraminidasique à 5°C ne précisent pas en outre s'ils ont étudié la riboflavoprotéine ou l'apoflavoprotéine, obtenue par filtration de la riboflavoprotéine sur gel de Sephadex G 25 avec une solution d'acide citrique de pH 3. Si cette dernière possède une activité sialidasique sur la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf, comme la CM-cellulose avec le tampon acétate d'ammonium en possède une sur la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf, les faibles teneurs en acide sialique trouvées par les auteurs, même après hydrolyse acide deviennent explicables. On peut s'étonner d'ailleurs, que les protéides contaminants mis en cause, n'aient pas pu être décelés par l'analyse immuno-électrophorétique que les auteurs ont appliquée avec beaucoup de précision et dont la sensibilité devait être accrue par l'emploi d'immun-sérums obtenus par injection à des lapins, de leurs préparations de flavoprotéine.

4° - CONCLUSIONS.

-1- Comme son homologue du jaune d'oeuf, la flavoprotéine du blanc d'oeuf est une glycoprotéine dont nous avons pour la première fois déterminé la composition du groupement glycanique, au niveau duquel se situent les principales différences entre les deux protéides.

En effet, la flavoprotéine du blanc d'oeuf se distingue de la flavoprotéine du jaune d'oeuf par l'absence de glucose et de fucose, par la présence d'acide sialique, par un rapport oses "neutres" / glucosamine inverse et par un rapport molaire mannose / galactose distinct : égal à 3,5 dans la première, il est voisin de 1 dans la seconde.

-2- Le taux plus faible d'acide sialique dans l'apoflavoprotéine indique une activité légèrement sialidasique de la CM-cellulose.

-3- L'hydrolyse par la neuraminidase modifie totalement le comportement électrophorétique des flavoprotéides du blanc d'oeuf. Les acides sialiques font donc bien partie intégrante des molécules et doivent être impliqués dans la vitesse anodique des protéides.

L'hydrolyse totale des liaisons sialosyls, supprime, en outre, l'hétérogénéité en électrophorèse à pH 4,45. Ces résultats sont en faveur de la présence dans les différents composants du flavoprotéide du blanc d'oeuf, d'un nombre d'autant plus grand de résidus d'acide N-acétylneuraminique que leur vitesse anodique est plus grande.

Ces conclusions établissent une distinction nette entre nos résultats concernant les flavoprotéides du blanc d'oeuf et les résultats obtenus par OSTROWSKI, ZAK et KRAWCZYK avec le flavoprotéide du jaune d'oeuf. Ce dernier en effet, ne contiendrait pas d'acide sialique et l'hydrolyse par la neuraminidase serait sans effet sur sa mobilité électrophorétique. Nos études chimiques et électrophorétiques des hydrolysats neuraminidasiques des flavoprotéides du blanc d'oeuf, nous incitent cependant à penser que les flavoprotéides du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf sont, du point de vue de la composition en acide sialique, moins différents que les résultats le laissent paraître. Il est possible en effet, que les protéides étudiés par OSTROWSKI et al. aient été partiellement dénaturés ou que leur hydrolyse enzymatique n'ait pas été totale. Dans de telles conditions, nous avons montré que les flavoprotéides du blanc d'oeuf ne subissaient aucune modification appréciable de leur vitesse électrophorétique, lorsque les modalités de l'électrophorèse étaient semblables à celles employées par les auteurs.

B - COMPOSITION DE LA FRACTION PROTIDIQUE.

Nous avons étudié les compositions centésimale et molaire en acides aminés et déterminé les acides aminés N- et C- terminaux.

1° - DETERMINATION DES COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES.

-a- Méthodes.

Les acides aminés ont été déterminés dans la riboflavoprotéine, par chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon après une hydrolyse chlorhydrique.

Le tryptophane a été dosé selon la méthode colorimétrique de SPIES et CHAMBERS (488) d'une part et simultanément avec la tyrosine par la méthode spectrophotométrique de GOODWIN et MORTON (489) d'autre part. Nous avons appliqué cette dernière méthode à l'apoflavoprotéine, à la riboflavoprotéine native et saturée en riboflavine.

-b- Résultats et discussion.

Le Tableau XXII (p.175) permet de comparer nos résultats à ceux obtenus avec la flavoprotéine du jaune d'oeuf par OSTROWSKI, ZAK et KRAWCZYK, pour la composition centésimale, et le Tableau XXIII (p.176) à ceux récemment publiés par FARRELL et al. (490) pour la composition molaire de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf.

Nos résultats sont en bonne conformité avec ceux de FARRELL et al. sauf pour les teneurs en acide glutamique, en méthionine et en valine, pour lesquelles nos valeurs sont nettement supérieures. Ce sont ces mêmes valeurs qui distinguent les flavoprotéines du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf qui par ailleurs présentent des compositions très voisines.

Les teneurs en tyrosine et en tryptophane ont retenu plus particulièrement notre attention.

Au cours des dosages spectrophotométriques du tryptophane qui permettent la détermination simultanée de la teneur en tyrosine, nous avons constaté que par ce procédé 4,54 résidus de tyrosine seulement étaient titrables, alors que l'analyse chromatographique à l'Auto-analyseur en détectait 12. Or, la méthode spectrophotométrique ne s'applique que dans le cas où les groupes phénoliques de la tyrosine, présents dans une protéine non hydrolysée sont entièrement ionisés. Nous pouvions donc émettre l'hypothèse que dans la riboflavoprotéine, sur les 7 ou 8 résidus de tyrosine non titrables, un ou plusieurs étaient impliqués dans la liaison de la protéine

Tableau XXII

Composition en acides aminés des riboflavoprotéines du blanc et du jaune d'oeuf de Poule exprimée en g de résidus d'acides aminés p.100 g de protéides.

Nature des acides aminés	Riboflavoprotéine du blanc d'oeuf Résultats personnels	Riboflavoprotéine du jaune d'oeuf Résultats de OSTROWSKI <u>et al.</u> (491)
Acide aspartique	6,5	8,08
Acide glutamique	18	12,34
Arginine	2,4	3,76
Histidine	4,4	4,21
Lysine	7,3	7,67
Alanine	2,1	3,33
Cystine / 2	5,4	5,75
Glycocolle	1,6	2,95
Isoleucine	2,1	2,95
Leucine	5,5	5,07
Méthionine	12	3,04
Phénylalanine	3,4	3,35
Proline	3,1	3,21
Sérine	8,9	11,51
Thréonine	2,4	3,05
Tryptophanne	5,5	3,99
Tyrosine	6	4,86
Valine	4,3	2,86

Tableau XXIII

Composition molaire* en acides aminés de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf de Poule.

Nature des acides aminés	Résultats personnels	Résultats de FARRELL et al. (492)
Acide aspartique	18	20
Acide glutamique	44 ou 45	36,4
Arginine	5	5,6
Histidine	10	9,2
Lysine	18	17,2
Alanine	9 ou 10	13,9
Cystine / 2	17	15,9
Glycocolle	9	8,3
Isoleucine	6	7,1
Leucine	15 ou 16	14,8
Méthionine	29	8,2
Phénylalanine	7 ou 8	7,0
Proline	10	9,7
Sérine	33	28,8
Thréonine	7 ou 8	7,7
Tryptophanne	9 ou 10	8,8
Tyrosine	12	9,5
Valine	14	5,7

* : Pour une masse moléculaire de 32 000.

avec le noyau isocallozazine comme c'est le cas pour d'autres flavoprotéines, et que les autres étaient masqués comme le sont toutes les tyrosines de l'ovalbumine et 7 sur 12 dans la conalbumine. Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous avons appliqué la méthode spectrophotométrique à l'apoflavoprotéine, à la riboflavoprotéine native et saturée en riboflavine.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XXIV (p.178). On voit que la teneur en tryptophane est constante dans tous les cas, alors que le nombre de résidus de tyrosine varie avec le taux de riboflavine fixée. L'apoflavoprotéine contient 6,32 résidus titrables, la riboflavoprotéine native 4,54 et la riboflavoprotéine saturée en riboflavine seulement 0,98. La riboflavoprotéine native n'est donc pas saturée en riboflavine et la fixation du noyau de l'isocallozazine modifie considérablement la structure conformationnelle de la protéine.

Une anomalie flagrante apparaît cependant : sur les 9 à 12 résidus de tyrosine suivant les auteurs, dosés après hydrolyse chlorhydrique, 6,32 seulement sont détectables spectrophotométriquement dans l'apoflavoprotéine. Même dans cette dernière donc, les groupes phénoliques de toutes les tyrosines ne sont pas ionisables et le départ de la riboflavine ne "déplierait" qu'une partie de la protéine qui aurait une structure globulaire en pelote serrée.

2° - DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX.

-a- La dinitrophénylation n'a permis de caractériser aucun acide aminé en position N- terminale dans la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf. Ce résultat constitue une nouvelle différence avec la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf qui possède un acide aminé N- terminal : l'histidine.

-b- L'hydrazinolyse qu'OSTROWSKI et al. n'ont pas appliquée à la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf, nous a permis d'identifier l'acide aminé C-terminal de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf à l'acide glutamique.

3° - CONCLUSIONS.

-1- Les compositions en acides aminés des flavoprotéines du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf sont très voisines. Il s'agit de protéides riches en acides aminés dicarboxyliques. Les teneurs en acide glutamique, en méthionine et en valine pourraient constituer un nouveau caractère distinctif si elles étaient confirmées, car c'est à leur propos que nos valeurs ne concordent pas avec celles de FARREL et al..

Tableau XXIV

Compositions centésimale et molaire en tyrosine et en tryptophane de l'apoflavoprotéine et de la riboflavoprotéine native et saturée en riboflavine, du blanc d'oeuf de Poule. Selon la méthode spectrophotométrique de GOODWIN et MORTON (493).

Nature des protéides	Tryp. + Tyr. en g p.100 g	Tryp. en g p.100 g	Tyr. en g p.100 g	moles de Tyr. moles de Tryp.	moles de Tyr. *	moles de Tryp. *
Apoflavoprotéine	8,71	5,50	3,21	0,67	6,32	9,44
Riboflavoprotéine native	7,81	5,50	2,13	0,48	4,54	9,46
Riboflavoprotéine saturée en riboflavine	6,21	5,52	0,46	0,1	0,98	9,50

Tryp. : tryptophane ; Tyr. : tyrosine

* : Pour une masse moléculaire de 32 000 pour la flavoprotéine.

-2- Les protéines des deux flavoprotéides de l'oeuf se différencient en tout cas par l'absence d'acide aminé N- terminal dans la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf et par la présence d'histidine à la même extrémité de la flavoprotéine du jaune d'oeuf.

L'acide aminé C- terminal qui n'a pas été recherché par les auteurs dans la flavoprotéine du jaune d'oeuf, a été identifié à l'acide glutamique dans celle du blanc d'oeuf.

-3- La riboflavoprotéine saturée en riboflavine et non hydrolysée ne possède qu'un seul résidu ionisé de tyrosine accessible au titrage spectrophotométrique sur les 9 à 12 présents dans la protéine. Parmi les résidus non titrables, un ou plusieurs sont probablement impliqués dans la liaison riboflavine - protéine, et les autres, vraisemblablement enfouis à l'intérieur des molécules au voisinage de groupements hydrophobes qui les rendent inaccessibles au solvant. L'extraction de la riboflavine provoquerait une modification suffisamment importante de la conformation de la protéine pour démasquer ces résidus, les rendre accessibles à la phase aqueuse et permettre le départ du proton dissociable des groupes phénoliques de la tyrosine qui deviennent ainsi détectables en spectrophotométrie directe.

Ces résultats sont en accord avec ceux tirés par OSTROWSKI et al. de l'étude des courbes de titrage potentiométrique de la riboflavoprotéine et de l'apoflavoprotéine du jaune d'oeuf. Associés aux résultats de notre étude spectropolarimétrique, ils confirment l'idée générale selon laquelle les flavines modifient d'une façon très marquée la conformation spatiale des apoprotéines. (On peut se reporter à ce sujet aux recherches de KOTAKI, NAOI et YAGI (494) et de YAGI, NAOI, et KOTAKI (495) sur la D-amino-oxidase).

La totalité des résidus de tyrosine n'est cependant pas "libérée" quand la riboflavine est extraite de la riboflavoprotéine. Ce résultat nous permet d'émettre l'hypothèse que la structure conformationnelle d'une partie seulement de l'apoflavoprotéine du blanc d'oeuf est influencée par la présence de la riboflavine.

C - COMPOSITION EN PHOSPHORE.

Nous avons dosé le phosphore dans la riboflavoprotéine et dans l'apoflavoprotéine après minéralisation par les acides sulfurique et perchlorique d'une part et après hydrolyse enzymatique d'autre part.

Dans les généralités, nous avons vu que RHODES et al. avaient isolé deux apoprotéines et que selon ces auteurs la présence de nombres différents de résidus "phosphoryle" dans les deux protéides était responsable de leurs comportements chromatographique et électrophorétique distincts. Afin de vérifier ces résultats, nous avons étudié le comportement électrophorétique de la riboflavoprotéine et de l'apoflavoprotéine déphosphorylées par la phosphatase acide. Pour que cette étude électrophorétique pût être interprétable, il fallait nous assurer que l'hydrolyse des liaisons "phosphoryle" était totale. C'est pourquoi nous avons suivi la cinétique de libération du phosphore sous l'action de l'enzyme.

1° - METHODES.

-a- Le phosphore a été dosé par la méthode colorimétrique d'ALLEN (496).

-b- L'hydrolyse enzymatique a été conduite selon les conditions expérimentales générales de SNELL et SNELL (497). 25 mg de protéide en solution dans 7,5 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 5,5 ont été additionnés de 1300 unités de phosphatase acide de germes de blé* (orthophosphoric monoester phosphohydrolase : 3.1.3.2). Les solutions ont été dialysées contre le tampon dans un bain-marie à 37°C. Toutes les heures, pendant 10 heures, des fractions aliquotes de 10 ml ont été prélevées et le phosphore dosé.

Pour les études électrophorétiques, après 7 heures d'incubation, les hydrolysats ont été dialysés contre eau distillée et lyophilisés. Des solutions à 5 p.100 des protéides déphosphorylés ont été soumises à l'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose avec les tampons véronal de pH 8,65 et acétate d'ammonium de pH 4,45.

2° - RESULTATS.

-a- Compositions centésimale et molaire en phosphore.

Les résultats que nous donnons ici, résultent de 6 séries de dosage effectués sur 5 échantillons différents de riboflavoprotéine et 5 échantillons différents d'apoflavoprotéine.

* : Fournisseur : MILES LABORATORIES, INC. Code n° 33-014

Une unité de phosphatase augmente de 0,5 la densité optique à 430 nm, après incubation avec le substrat : p-nitrophényl phosphate, à 37°C, pendant 15 mn.

Dans tous les cas, indifféremment avec la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine, les valeurs que nous avons trouvées étaient comprises entre 0,78 p.100 et 0,82 p.100, soit 8 résidus de phosphore par molécule de masse moléculaire 32 000.

La figure 50 (p.182) montre en outre que la libération des groupes "phosphoryle" est totale après 5 h d'incubation, aussi bien dans le cas de la riboflavoprotéine que dans celui de l'apoflavoprotéine.

-b- Etude électrophorétique de la riboflavoprotéine et de l'apoflavoprotéine déphosphorylées.

L'hydrolyse par la phosphomonoestérase diminue considérablement la vitesse anodique de la riboflavoprotéine et de l'apoflavoprotéine comme en témoignent les électrophorèses représentées à la figure 51 (p.183). On remarquera en outre, que sur les électrophorèses effectuées avec le tampon acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, les deux protéides ont conservé leur hétérogénéité, bien que dans les conditions expérimentales que nous avons décrites, la libération des résidus "phosphoryle" ait été totale.

3° - CONCLUSIONS.

-1- Nos résultats confirment ceux de RHODES et al. (498) quant à la teneur en phosphore de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf qui contient 0,8 p.100 de phosphore soit 8 résidus par mole de masse moléculaire 32 000. Cette valeur établit un nouveau caractère distinctif avec la flavoprotéine du jaune d'oeuf qui n'en renferme que 0,2 p.100.

-2- La déphosphorylation des flavoprotéides du blanc d'oeuf modifie leur comportement électrophorétique, mais n'annule pas leur hétérogénéité. Ces résultats infirment les conclusions de RHODES et al. d'après lesquelles l'hétérogénéité de l'apoflavoprotéine serait due à la présence de nombres différents de résidus "phosphoryle" dans les deux apoprotéines. Il faut rappeler d'ailleurs, que ces auteurs ont peut-être comparé, à une époque où les techniques chromatographiques et électrophorétiques étaient moins élaborées qu'aujourd'hui, deux préparations dont l'une pouvait être dénaturée, comme nous l'avons vu dans notre étude des méthodes de préparation de l'apoflavoprotéine.

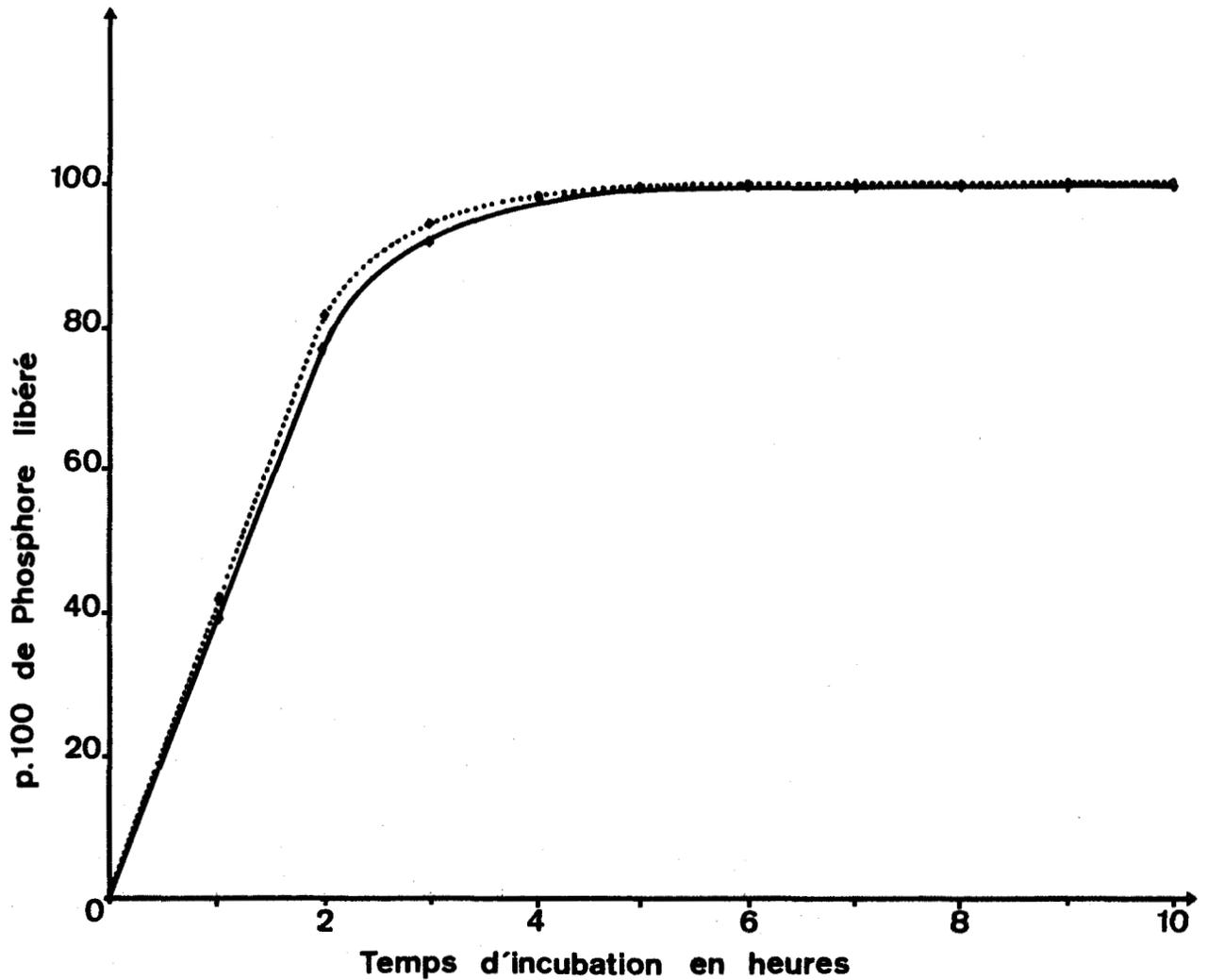


Figure 50

Libération enzymatique du phosphore de la riboflavoprotéine (—) et de l'apoflavoprotéine (.....) du blanc d'oeuf par la phosphatase acide de germes de blé.

Pour les conditions expérimentales, voir le texte à la page 180.

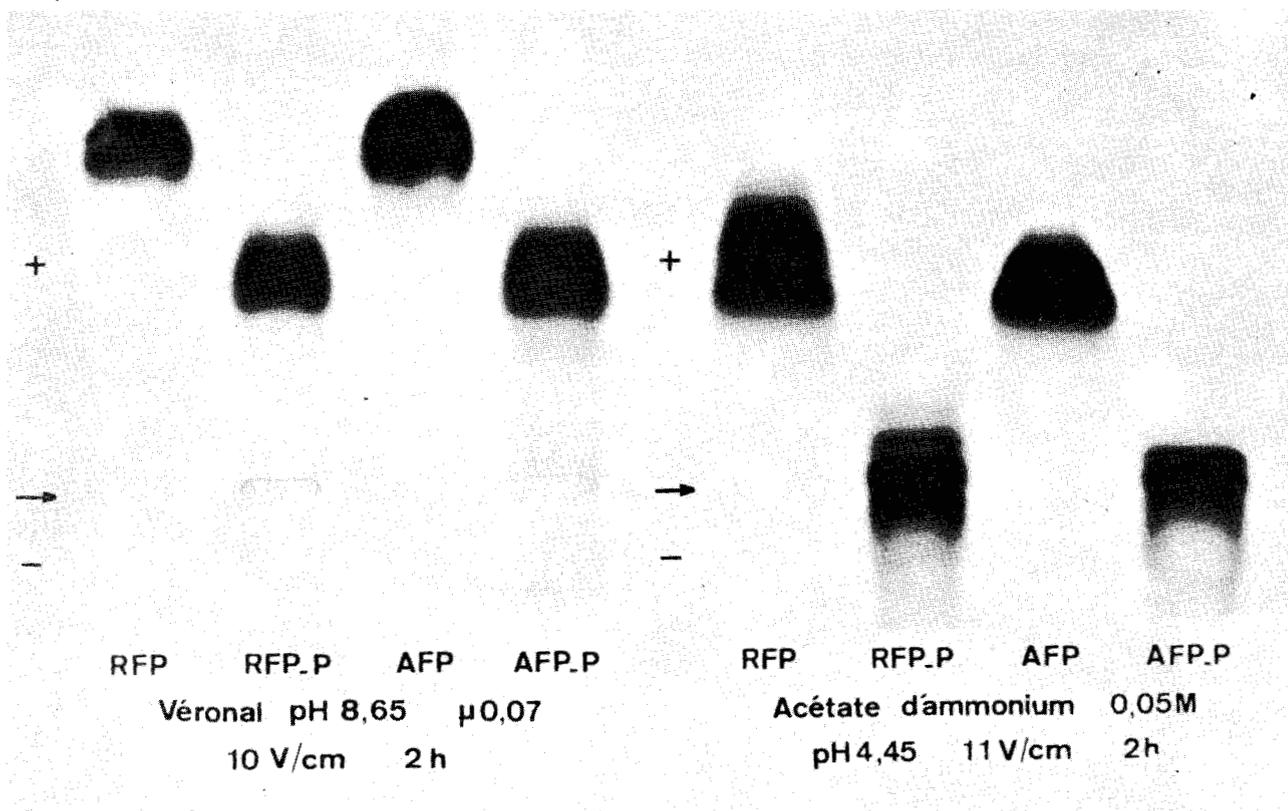


Figure 51

Electrophorèse sur acétate de cellulose en tampon véronal et en tampon acétate d'ammonium de la riboflavoprotéine (RFP), de l'apoflavoprotéine (AFP) et des deux protéides déphosphorylés par la phosphatase acide (RFP-P ; AFP-P).

D - COMPOSITION CENTESIMALE EN RIBOFLAVINE DE LA
RIBOFLAVOPROTEINE ET CAPACITE TOTALE DE FIXATION
DE LA RIBOFLAVINE.

1° - MATERIEL ET METHODES.

La riboflavine a été dosée par deux méthodes différentes.

-a- La méthode microbiologique de SNELL et STRONG (499) utilisant Lactobacillus caséi comme microbe réactif a été employée pour doser la riboflavine dans la riboflavoprotéine native d'une part et dans l'apoflavoprotéine saturée en riboflavine, après dialyse et lyophilisation d'autre part.

-b- La méthode spectrofluorimétrique de dosage de la riboflavine libre de BESSEY et al. (500) a été utilisée pour déterminer la capacité de fixation de la riboflavine par la riboflavoprotéine native et l'apoflavoprotéine, avant et après hydrolyse par la phosphatase et par la neuraminidase.

Pour appliquer cette méthode nous avons mis à profit la propriété, bien mise en évidence par RHODES et al. (501) que possède l'apoflavoprotéine d'éteindre totalement la fluorescence de la riboflavine combinée à elle. Un ml d'une solution contenant un poids p de protéides, parfaitement connu et voisin de 1 mg par ml de tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 5,5 est additionné d'un ml d'une solution renfermant 20 µg de riboflavine par ml du même tampon, puis dilué à 10 ml. L'intensité de la fluorescence est lue directement à 530 nm avec comme source d'excitation la raie du mercure à 435,8 nm. La riboflavoprotéine n'émettant pas de fluorescence, seule la riboflavine libre est ainsi dosée et les quantités présentes (r_1) sont déterminées par comparaison avec des témoins contenant des poids parfaitement connus de riboflavine. Le poids en µg de riboflavine fixée (r_2) par mg de protéide est donné par la relation : $r_2 = \frac{20 - r_1}{p}$.

2° - RESULTATS.

La riboflavoprotéine native contient 5,5 µg de riboflavine par mg et, même après hydrolyse par la phosphatase ou la neuraminidase, elle peut fixer 6,5 µg supplémentaires de riboflavine par mg.

1 mg d'apoflavoprotéine fixe dans les mêmes conditions 12 à 12,5 µg de riboflavine par mg.

3° - CONCLUSIONS.

La teneur en riboflavine de la riboflavoprotéine native et sa capacité totale de fixation de la riboflavine démontrent que 54 p.100 des protéides présents dans les préparations de riboflavoprotéine existent sous la forme d'apoflavoprotéine. Ces résultats confirment bien ceux que nous avons obtenus par intégration des pics d'enregistrement densitométrique des électrophorégrammes de riboflavoprotéine. Des résultats semblables ont été obtenus par ZAK et OSTROWSKI (502) avec la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf. Cette dernière possède toutefois une capacité totale de fixation de la riboflavine plus faible (1,04 p.100) que celle de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf. Mais, en tenant compte des masses moléculaires différentes des protéides, une molécule de riboflavine peut se combiner à une molécule d'apoprotéine, dans les deux cas.

La déphosphorylation, pas plus que l'élimination des résidus d'acide sialique, n'affectent la capacité de fixation de la riboflavine par les flavoprotéides du blanc d'oeuf.

3 - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE LA FLAVOPROTEINE DU BLANC D'OEUF.

I - L'application du procédé de RHODES, BENNETT et FEENEY de préparation de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf, ne nous a pas fourni des échantillons de riboflavoprotéine pure. Le procédé de purification par chromatographie sur DEAE-cellulose que nous avons mis au point permet d'obtenir une riboflavoprotéine homogène en immuno-électrophorèse et qui se trouve dans le blanc d'oeuf dans la proportion de 0,9 p.100 des protéides totaux.

La chromatographie de la riboflavoprotéine sur CM-cellulose ne nous a pas fourni, comme aux auteurs précédents, deux apoprotéines en quantités égales, mais deux fractions en proportions très différentes. Les comportements électrophorétique et immuno-électrophorétique anormaux de la fraction mineure, nous l'a fait considérer comme résultant de la dénaturation de certains protéides de la riboflavoprotéine native.

L'analyse immuno-électrophorétique de nos préparations nous a permis d'identifier l'arc de la préalbumine des immuno-électrophorégrammes du blanc d'oeuf à la ligne de précipitation de la flavoprotéine.

II - L'ensemble de nos recherches sur les propriétés physiques et chimiques de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf, confirme les déterminations effectuées par RHODES et al. en 1959, d'après lesquelles environ 50 p.100 seulement des protéides présents dans les préparations sont combinés à la riboflavine. A saturation, la riboflavoprotéine contient 1,20 p.100 de riboflavine et la combinaison avec l'apoprotéine est équimoléculaire. Ni les acides sialiques, ni les groupes "phosphoryle" n'interviennent dans la fixation de la riboflavine.

La flavoprotéine du blanc d'oeuf possède en commun avec d'autres flavoprotéides, les propriétés de déplacer vers des longueurs d'onde plus longues, les bandes d'absorption dans la lumière visible, de la riboflavine, d'une part, et d'éteindre la fluorescence de celle-ci, d'autre part.

Hormis sa masse moléculaire de 32 000, ses caractères propres découlent de sa composition chimique. Parmi les plus marquants et qui constituent, pour la plupart, notre apport personnel dans la connaissance de ce protéide nous pouvons citer :

-1- Le comportement électrophorétique. En électrophorèse de zone en tampon acide et en électrofocalisation, la riboflavoprotéine est hétérogène. Trois fractions ont pu être caractérisées parmi lesquelles une, existe dans la riboflavoprotéine native sous la forme d'apoprotéine. Leur point isoélectrique est égal à 3,95 ; 3,85 et 3,70. La vitesse des apoflavoprotéines est modifiée lorsqu'elles sont combinées à la riboflavine.

-2- Le flavoprotéide du blanc d'oeuf, est une sialoglycophosphoprotéine qui contient 0,9 p.100 d'acide N-acétylneuraminique et 0,8 p.100 de phosphore. L'hydrolyse de ces composants, respectivement par la neuraminidase et par la phosphatase acide, modifie considérablement le comportement électrophorétique, mais, tandis que le premier enzyme annule l'hétérogénéité, le second est sans effet sur elle. Il semble donc qu'il faille impliquer dans ce phénomène non pas comme l'ont fait RHODES et al., des nombres différents de résidus "phosphoryle" dans chacun des composants mais plutôt des nombres différents de résidus d'acide sialique.

Les autres glucides qui constituent le groupement glycanique de la flavoprotéine du blanc d'oeuf sont le galactose, le mannose et la N-acétylglucosamine dont les teneurs, les proportions relatives, les nombres de résidus par molécule de riboflavoprotéine sont caractéristiques.

-3- La protéine est riche en acides aminés dicarboxyliques et ne possède pas de fonction amine libre en position N- terminale. L'acide aminé C- terminal est l'acide glutamique.

-4- Les études spectropolarimétriques et les déterminations spectrophotométriques de la teneur en tyrosine montrent le rôle important que joue la fixation de la riboflavine sur la structure conformationnelle de la protéine dont on peut imaginer qu'elle possède la forme spatiale d'une pelote globulaire.

-5- La comparaison des propriétés des riboflavoprotéines du blanc d'oeuf et du jaune d'oeuf, démontre que les deux protéides sont physico-chimiquement différents et que les caractères distinctifs les plus évidents concernent la composition du groupement glycanique. Les fractions protéiques semblent présenter au contraire, de grandes analogies et on peut imaginer qu'elles possèdent des structures suffisamment voisines pour que les sites antigéniques les rendent immunologiquement indiscernables comme l'ont constaté: OSTROWSKI et al..

L'OVOMUCOÏDE

1 - PREPARATION.

I - PRINCIPE.

En nous fondant sur les conclusions tirées par MONTREUIL et coll. (503) de leur étude critique des méthodes de préparation de l'ovomucoïde d'une part et sur les résultats de nos recherches concernant les méthodes chromatographiques de préparation ou de purification de l'ovoglycoprotéine, de l'ovoinhibiteur et de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf d'autre part, nous avons adopté, pour préparer l'ovomucoïde, le protocole expérimental en deux étapes, suivant :

Première étape : préparation de l'ovomucoïde "brut" par la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (504) qui d'après MONTREUIL et coll. (505) fournit rapidement les meilleurs échantillons d'ovomucoïde.

Deuxième étape : chromatographie sur DEAE-cellulose de l'"ovomucoïde" selon FREDERICQ et DEUTSCH, avec le système de tampons que nous avons décrit pour la préparation et la purification de l'ovoglycoprotéine (voir p.114) et pour la purification de la riboflavoprotéine (voir p.144). On sait que dans ces conditions, le lysozyme et l'ovoinhibiteur sont élués avec le tampon phosphate d'équilibration de la colonne de cellulose, l'ovoglycoprotéine avec le même tampon contenant du NaCl 0,2 M et la riboflavoprotéine quand la molarité du NaCl est portée à 0,5 M.

II - MODE OPERATOIRE.

A - PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE SELON LA METHODE DE FREDERICQ ET DEUTSCH. (506)

Les protéides de 3 100 ml de blanc d'oeuf sont dénaturés par l'acide trichloracétique, et l'ovomucoïde est isolé du filtrat par plusieurs précipitations éthanoliques dans des conditions de température, de pH, de concentration alcoolique et de force ionique différentes, comme il est indiqué sur le schéma de la figure 52 (p.189).

3100 ml de blanc d'oeuf (100 oeufs) homogénéisés pendant 1 mn à l'aide d'un mixer. Ajuster le pH à 3,5 avec SO_4H_2 N.. Ajouter un volume d'une solution aqueuse de trichloracétate de sodium à 10g p.100 ml ajustée à pH 3. Ajuster le pH à 3,5. Laisser reposer une nuit à la température du laboratoire.

Filtrer sur büchner.

Précipité I éliminé
(protéides dénaturés)

Filtrat

Ajuster le pH à 6 avec de la soude 0,5 N.
Refroidir à 0°C et ajouter 2 vol. d'éthanol à 96 p. 100 (v:v). Refroidir à -15°C.
Laisser reposer 4 heures à -8°C. Centrifuger.

Précipité II

Surnageant éliminé.

Le dissoudre dans une petite quantité d'eau distillée. Dialyser pendant 3 jours contre eau distillée. Filtrer. Lyophiliser.

Faire une solution à 2 g p.100 ml de la poudre obtenue. Ajuster le pH à 3,2 avec HCl N et la force ionique à 0,02 (ajouter du ClNa). Refroidir à 0°C. Ajouter un volume d'éthanol à 95 p. 100 (v:v) à -15°C. Laisser reposer une nuit à 0° C. Centrifuger et reprendre le précipité par l'eau distillée.

Précipité II A

Dialyser pendant 3 jours contre eau distillée. Filtrer. Lyophiliser. La poudre obtenue est reprécipitée dans les mêmes conditions d'obtention du précipité II A mais avec une concentration alcoolique finale de 42 p. 100 (v:v).

Surnageant

Ajouter de l'éthanol absolu à -15°C de façon à amener la concentration alcoolique à 65 p.100 (v:v). Laisser décanter une nuit à -8°C.

Précipité II C
Recueilli en plusieurs fois et dissous dans 100 ml d'eau distillée. Dialyser 3 jours. Filtrer Lyophiliser.

Surnageant éliminé.

Précipité II B
Recueilli en plusieurs fois et dissous dans 50 ml d'eau distillée. Dialyser 3 jours. Filtrer. Lyophiliser.

Surnageant éliminé.

Rendements :
Précipité II (ovomucoïde "brut")....: 20,4 g
Précipité II B.....: 0,77 g
Précipité II C (ovomucoïde "purifié"): 14,2 g

Figure 52

Schéma de préparation de l'ovomucoïde
selon le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (507).

En raison du faible rendement en précipité II B et de la grande hétérogénéité immuno-électrophorétique du précipité II C (voir Fig. 4 ; p.26), nous avons utilisé le précipité II total qui fournit 20,4 g d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH. C'est d'ailleurs cette fraction qui a servi de matériau d'étude à ADAM-CHOSSON (508), à MONTREUIL et coll. (509) et à MONSIGNY et al. (510), ainsi qu'à la plupart des auteurs qui ont utilisé ce procédé de préparation de l'ovomucoïde.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DES PREPARATIONS
D'OVOMUCOÏDE OBTENUES PAR LA METHODE DE FREDERICQ
ET DEUTSCH.

3 g d' "ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH sont dissous dans 30 ml de tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 8 (tampon n° 1). La solution est appliquée au sommet d'une colonne de DEAE-cellulose* "équilibrée" avec le même tampon. L'élution des protéides est obtenue par le passage du tampon n° 1 auquel on ajoute ensuite du NaCl dont la molarité est portée successivement à 0,1 M, à 0,2 M et à 0,5 M.

III - RESULTATS.

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure 53 (p.191).

Le chromatogramme d'un fractionnement "d'ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH (ovo FD₂) sur DEAE-cellulose présente trois pics A, B et C en proportions très différentes qui fournissent respectivement 2,700 g, des traces et 0,080 g de protéides. Les protéides de la fraction A, qui représentent 97 p.100 des protéides élués, constituent la fraction ovomucoïde et montrent en électrophorèse sur acétate de cellulose avec le tampon véronal (μ -0,07 ; pH 8,65) une image pratiquement identique à celle de la préparation d'ovomucoïde selon FREDERICQ et DEUTSCH (ovo FD₁). Les traces de protéides fournis par le pic B n'ont pas été analysées, toutefois leur comportement chromatographique (élution avec le tampon phosphate 0,005 M, NaCl 0,2 M pH 8) permet de supposer qu'il s'agit d'ovoglycoprotéine. Quant aux protéides du pic C, ils possèdent le comportement électrophorétique de préalbumine de la flavoprotéine que l'on caractérise sur l'électrophorégramme de la préparation ovo FD₂ qui a été fractionnée. Le pic C est considérablement réduit lorsqu'une préparation du type ovo FD₁ qui ne contient pas de flavoprotéine détectable en électrophorèse est soumise au fractionnement chromatographique.

* DEAE-cellulose : DE 32 ; WHATMAN - CHROMEDIA.

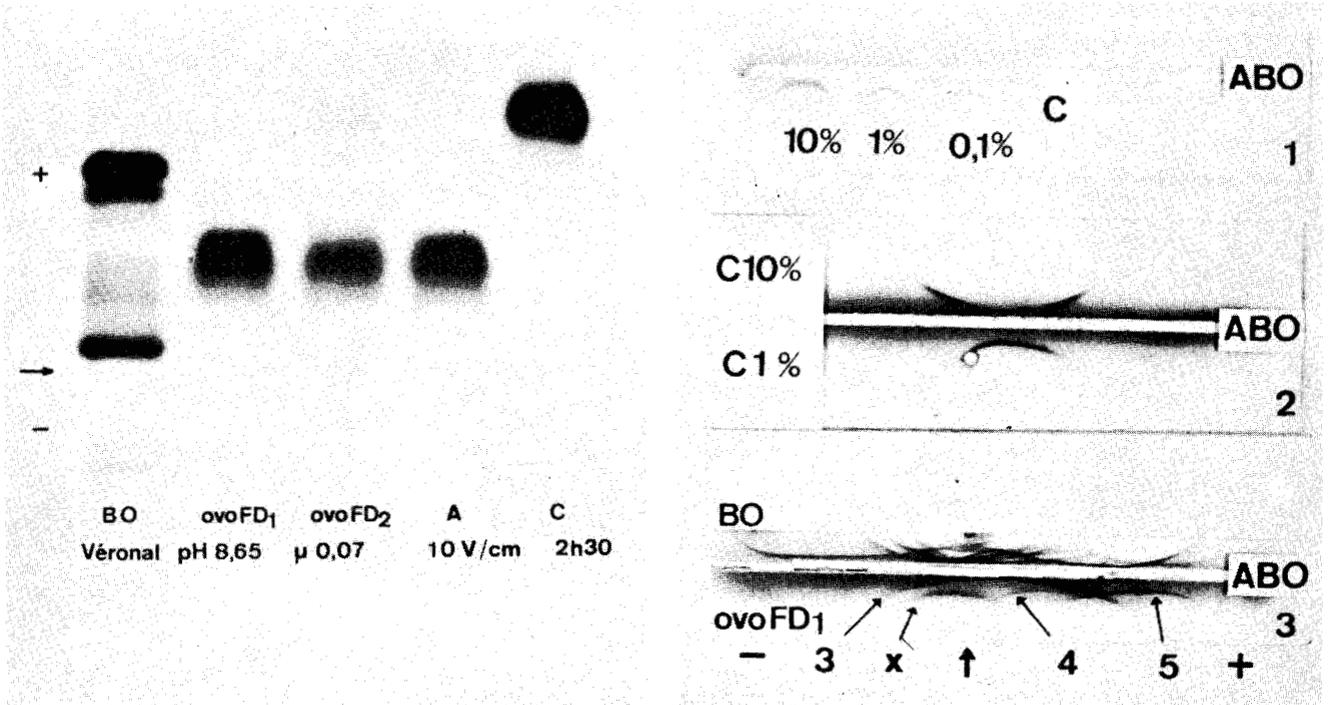
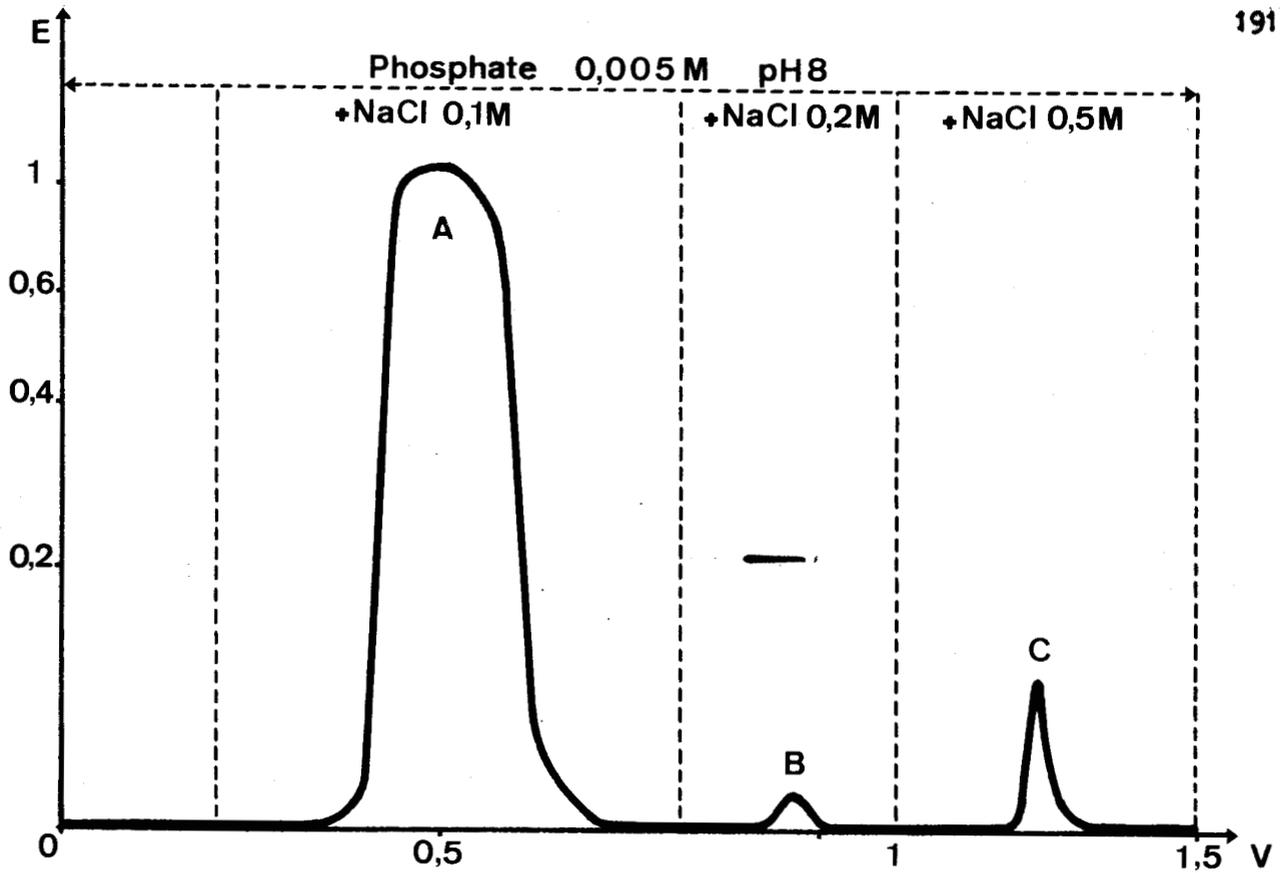


Figure 53

Diagramme d'élution sur DEAE-cellulose des protéides d'une préparation d'ovomucoïde obtenue par la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (ovo FD₂), électrophorèse sur acétate de cellulose des fractions A et C, immuno-électrophorèse et immuno-diffusion de la fraction C. ovo FD₁ et ovo FD₂ : "ovomucoïdes" de FREDERICQ et DEUTSCH ; BO : blanc d'oeuf ; ABO : immunosérum anti-protéides du blanc d'oeuf.

L'immuno-diffusion que nous avons appliquée à des solutions à 10 p.100, 1 p.100 et 0,1 p.100 des protéides du pic A dans un tampon véronal de pH 8,2 ne révèle (plaque 1 de la Fig. 53 ; p.191) après 24 h. de réaction avec l'immunsérum anti-protéides du blanc d'oeuf qu'une seule ligne de précipitation qui possède en immuno-électrophorèse le comportement de globuline β_1 de l'ovomucoïde (plaque 2). Une préparation d'ovomucoïde selon le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH, analysée sur la plaque 3 montre au contraire 4 arcs de précipitation correspondant à l'ovomucoïde (arc n° 3), à une globuline β_2 (arc x situé à l'intérieur du précédent), à l'ovoglycoprotéine (arc n° 4) et à la flavoprotéine (arc n° 5).

IV - CONCLUSIONS.

L'emploi de la DEAE-cellulose associée à un tampon phosphate de pH 8 et à un gradient discontinu de concentration en NaCl, nous a permis d'isoler, en une seule étape, avec un rendement de 90 p.100, l'ovomucoïde pur des préparations d'ovomucoïde obtenues par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH. Ce succès facile, là où tant d'auteurs ont échoué, peut s'expliquer aisément. En effet, nous nous sommes adressé à des préparations d'ovomucoïde dont la contamination par d'autres protéides du blanc d'oeuf était mineure, comme le prouvent nos résultats chromatographiques. La plupart des auteurs, au contraire, (voir les généralités ; p.20) ont tenté la purification de préparations obtenues par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY dont nous avons démontré l'hétérogénéité dans l'étude des méthodes de préparation de l'ovoinhibiteur (voir p.59) et dont nous préciserons la composition en protéides du blanc d'oeuf dans le chapitre suivant. D'autre part et surtout, nous avons utilisé une cellulose échangeuse d'anions dont la capacité d'échange et le pouvoir de résolution étaient très supérieurs à ceux des résines dont avaient pu disposer nos prédécesseurs.

Les résultats parfaitement reproductibles des fractionnements chromatographiques qui ont été effectués quantitativement et qui sont la moyenne de plusieurs dizaines d'expériences justifient a posteriori le choix qu'ont fait dès 1962, MONTREUIL et coll. (511) de "l'ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH comme matériel d'étude pour leurs recherches sur la structure de l'ovomucoïde, choix fondé, à l'époque sur la base de la recherche du procédé susceptible d'introduire le moins de dénaturation et sur l'analyse électrophorétique.

2 - PROPRIETES PHYSIQUES.

I - METHODES APPLIQUEES.

- Ultracentrifugation :
 - Détermination des constantes de sédimentation et de diffusion
 - Mesure de la masse moléculaire à l'approche de l'équilibre de sédimentation.
- Pycnométrie : mesure du volume spécifique partiel.
- Spectrophotométrie d'absorption : détermination du coefficient d'extinction au maximum d'absorption de l'ultraviolet.
- Spectropolarimétrie : mesure du pouvoir rotatoire spécifique.

II - RESULTATS.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXV (p.194) et illustrés quant à l'ultracentrifugation par la figure 54 (p.195).

A - ULTRACENTRIFUGATION.

La sédimentation de l'ovomucoïde purifié a été étudiée sur des solutions à 5,8 et 15 mg de protéides par ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7. Dans tous les cas, les diagrammes d'ultracentrifugation montrent un seul pic parfaitement symétrique contrairement aux pics asymétriques fournis par les préparations étudiées par MONTREUIL et coll. (voir les généralités ; Fig. 6 ; p.29).

Les valeurs des constantes de sédimentation et de diffusion et du volume spécifique partiel (\bar{v}) sont très voisines de celles déterminées par FREDERICQ et DEUTSCH (512) sur leurs propres préparations et des mesures effectuées par CHATTERJEE et MONTGOMERY (513) sur des préparations d'ovomucoïde obtenues par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY et purifiées sur DEAE-cellulose (voir les généralités ; p.21).

L'application de la méthode de SVEDBERG nous a permis de calculer une masse moléculaire de 26 700 que les déterminations à l'approche de l'équilibre de sédimentation effectuées sur des solutions à 8 mg par ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7, à 13 410 t/mn, 21 740 t/mn, 33 450 t/mn et 47 660 t/mn,

Tableau XXV

Propriétés physiques de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule.

	Résultats personnels	Résultats obtenus par d'autres auteurs.
S_{20w}° (SVEDBERG)	2,72	2,8 (a) (b)
D_{20w}° (10^{-7} . cm ² . sec ⁻¹)	7,97	8 (a)
ν (ml/g)	0,683	0,685 (a)
Masse moléculaire		
Méthode de SVEDBERG	26 700	27 000 (a)
Equilibre de sédimentation	26 670	
ζ 1 p.100 278 m μ		4,1 (b); 6,1 (c)
ovomucoïde purifié	3,9	
"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH (514)	3,9	
"ovomucoïde" de FORSYTHE et FOSTER (515)	6,7	
"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY (516)	6,25	
$[\alpha]_{546}^{20^{\circ}}$	- 92 °	
$[\alpha]_{578}^{20^{\circ}}$	- 78 °	- 78 ° (b)

- (a) FREDERICQ et DEUTSCH (517) avec leurs propres préparations.
- (b) CHATTERJEE et MONTGOMERY (518) à une longueur d'onde non précisée par les auteurs, avec des préparations obtenues par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY et purifiées sur DEAE-cellulose.
- (c) RHODES, AZARI et FEENEY (519) avec des préparations obtenues par chromatographie du blanc d'oeuf sur CM-cellulose.

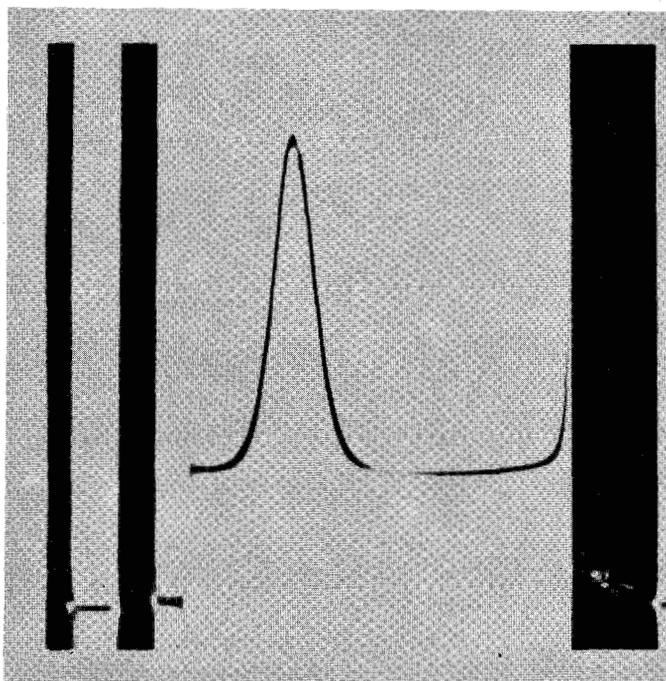


Figure 54

Diagramme d'ultracentrifugation de l'ovomucoïde. Tampon phosphate 0,1M de pH 7 ; température 20°C ; inclinaison de la barre : 60° ; concentration : 15 mg/ml. Cliché photographique pris après 154 mn de centrifugation.

confirment avec une valeur de 26 670. Nos résultats confirment donc ceux de FREDERICQ et DEUTSCH (520), mais s'éloignent de la valeur de 24 400 proposée par MONTREUIL et coll. (521) comme masse moléculaire moyenne des préparations d'ovomucoïde.

B - PROPRIETES OPTIQUES.

1° - ABSORPTION DE LA LUMIERE ULTRA-VIOLETTE.

Le Tableau XXV (p.194) montre que les coefficients d'extinction $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ des préparations d'ovomucoïde purifiées sur DEAE-cellulose par CHATTERJEE et MONTGOMERY et par nous-même sont semblables et très voisines des valeurs que nous avons obtenues avec des préparations selon la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH. Toutes ces valeurs s'éloignent nettement du $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ 6,1 déterminé par RHODES et al. (522) et des mesures que nous avons effectuées sur des préparations d'ovomucoïde selon les procédés de FORSYTHE et FOSTER et de LINEWEAVER et MURRAY dont nous avons vu dans les deux premiers chapitres, combien elles étaient souillées par d'autres protéides du blanc d'oeuf et par le lysozyme en particulier dont le coefficient d'extinction est très élevé (la fraction lysozyme A de la figure 34 ; p.116 possède un $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ 15,2).

La valeur légèrement supérieure obtenue par CHATTERJEE et MONTGOMERY peut s'expliquer aussi par la présence de protéides contaminants sans que l'on puisse cependant exclure l'éventualité de l'enrichissement de leur préparation en un composant de l'ovomucoïde possédant un coefficient d'extinction plus élevé. Ces auteurs en effet, n'ont retenu que les fractions d'éluion dont la densité optique à 278 nm était la plus forte, une fraction riche en glucides mais de plus faible densité optique étant éliminée.

2° - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE.

Le pouvoir rotatoire spécifique de l'ovomucoïde purifié a été trouvé égal à - 92 ° et à - 78 ° respectivement à 546 nm et 578 nm. Une valeur de - 78 ° a également été déterminée par CHATTERJEE et MONTGOMERY (523), mais ces auteurs n'ont pas précisé la longueur d'onde à laquelle ils avaient effectué leurs mesures.

III - CONCLUSIONS.

Les propriétés physiques de l'ovomucoïde purifié sont très voisines de celles déterminées par FREDERICQ et DEUTSCH avec leurs propres préparations

et se rapprochent beaucoup des déterminations effectuées par CHATTERJEE et MONTGOMERY avec des préparations obtenues par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY et purifiées sur DEAE-cellulose. Les coefficients d'extinction des préparations d'ovomucoïde selon les méthodes de FORSYTHE et FOSTER et de LINEWEAVER et MURRAY s'apparentent aux résultats de RHODES et al. Leur valeur élevée par rapport à celle des préparations précédentes doit être imputée à la présence de protéides contaminants et du lysozyme en particulier.

3 - PROPRIETES CHIMIQUES.

I - METHODES APPLIQUEES.

- Détermination des compositions centésimale et molaire en glucides.
- Détermination des compositions centésimale et molaire en acides aminés.
- Détermination des acides aminés N- et C- terminaux.

Les procédés employés ont été précisés dans les chapitres précédents.

II - COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES.

A - RESULTATS.

L'ovomucoïde purifié possède la composition en glucides totaux suivante :

Oses "neutres"	:	8 p.100
N-acétylglucosamine	:	13,50p.100
Acide N-acétylneuraminique	:	0,93p.100
Oses "neutres"/N-acétylglucosamine	:	0,59
Oses "neutres"/Ac. N-acétylneuraminique:	:	8,60
Mannose / galactose	:	5

La composition molaire en oses, pour une masse moléculaire de l'ovomucoïde de 26 700 peut donc être établie comme suit : (en moles p. mole de M M 26 700)

Galactose	:	2,19
Mannose	:	10,95
N-acétylglucosamine	:	17,75
Acide N-acétylneuraminique	:	0,85

B - CONCLUSIONS.

1° - La comparaison de nos valeurs avec celles de MONTREUIL et coll. (524) rassemblées dans le Tableau VI (p.36) montre que les résultats sont très semblables à ceux décrits par les auteurs à propos des "ovomucoïdes" préparés par les méthodes les moins drastiques ; l'analogie est particulièrement nette avec les préparations obtenues par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH.

2° - Les nombres décimaux que nous avons obtenus pour la composition molaire et en particulier le nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique inférieur à l'unité ne constituent qu'une ambiguïté apparente. Nous démontrerons en effet dans la dernière partie de ce mémoire que l'ovomucoïde est hétérogène et que la composition en glucides des différentes fractions varie dans de larges proportions de l'une à l'autre.

3° - Dans les généralités, nous avons vu que MONTREUIL et coll. et MONSIGNY et al., en se fondant sur l'hétérogénéité immuno-électrophorétique de l'"ovomucoïde" d'une part, et sur la composition en oses des glycopeptides présents dans les hydrolysats pronasiques d'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH d'autre part, ont émis l'hypothèse que les glycopeptides riches en acide sialique provenaient de l'ovoglycoprotéine de KETTERER et que seuls les glycopeptides dépourvus d'acide sialique avaient pour origine l'ovomucoïde. La présence d'acide sialique dans l'ovomucoïde immuno-électrophorétiquement homogène nous permet dès à présent d'interpréter différemment ces résultats et de rattacher les sialoglycopeptides à l'ovomucoïde. Nous préciserons ce point plus loin.

III - COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE EN ACIDES AMINES.

A - RESULTATS.

Le Tableau XXVI (p.199) permet de comparer nos résultats, pour la composition centésimale, aux valeurs obtenues par OSUGA et FEENEY (525) en 1963 avec un "ovomucoïde" préparé selon la méthode de LINEWEAVER et MURRAY et purifié sur CM-cellulose et DEAE-cellulose d'une part et aux déterminations effectuées par KANAMORI et KAWABATA (526) en 1969, sur des échantillons préparés selon leur procédé au sulfate d'ammonium, et purifiés sur DEAE-cellulose d'autre part. Les compositions molaires déterminées par les auteurs et par nous même n'ont pas été comparées ; ceux-ci en effet ont adopté pour l'ovomucoïde une masse moléculaire de 28 000 tandis que nous avons basé nos calculs sur une masse moléculaire de 26 700.

Tableau XXVI

Compositions centésimale et molaire en acides aminés de l'ovomucoïde de l'oeuf de Poule.

Nature des acides aminés	Composition centésimale (a)			Composition molaire (c) Résultats personnels.
	Résultats personnels	Résultats de OSUGA et FIBENEY(527)(b)	Résultats de KANAMORI et KAWABATA(528)(b)	
Acide aspartique	12,26	13,11	6,57	28
Acide glutamique	6,33	6,86	9,22	13
Arginine	3,38	3,51	2,78	6
Histidine	2,18	2,10	2,93	4
Lysine	6,58	6,22	7,78	14
Alanine	2,70	2,96	3,29	10
Cystine / 2	12,9	12,76	-	17 ou 18
Glycocolle	3,23	3,33	2,07	15
Isoleucine	1,38	1,29	2,83	3
Leucine	4,73	4,93	5,25	11
Phénylalanine	2,43	2,78	3,15	4
Proline	3,41	2,67	2,77	9
Sérine	4,08	3,88	4,97	12 ou 13
Thréonine	5,18	5,27	3,61	14
Tryptophanne	0	0	1,74	0
Tyrosine	3,85	3,90	2,91	6
Valine	4,93	5,66	3,18	13

(a) en g de résidus d'acides aminés p. 100 g de protéide.

(b) calculée d'après les résultats des auteurs exprimés en nombre de résidus par mole d'ovomucoïde de masse moléculaire 28 000.

(c) en nombre de résidus d'acides aminés par mole d'ovomucoïde de masse moléculaire 26 700.



Nos résultats sont pratiquement identiques à ceux de OSUGA et FEENEY, mais s'éloignent considérablement des valeurs de KANAMORI et KAWABATA pour la plupart des acides aminés et en particulier pour les teneurs en acide aspartique, en acide glutamique, en glyco-colle, en isoleucine, en thréonine et en valine. Le tryptophane absent de nos préparations et des préparations de OSUGA et FEENEY représente 1,74 p.100 des échantillons analysés par KANAMORI et KAWABATA soit 3 résidus par molécule d'ovomucoïde de masse moléculaire 28 000. Or les premiers auteurs qui ont étudié la composition en acides aminés de l'ovomucoïde et qui ont travaillé sur des préparations impures ont toujours déterminé la présence de moins d'un résidu de tryptophane par mole d'ovomucoïde (LEWIS et al. (529) ; STEVENS et FEENEY (530)). Nous même avons constaté que les préparations obtenues par les procédés de FORSYTHE et FOSTER et de LINEWEAVER et MURRAY dans lesquelles nous avons observé la présence de quantités notables d'autres protéides du blanc d'oeuf, contenaient selon les échantillons entre 0,8 et 1,30 p.100 de tryptophane : acide aminé que les méthodes colorimétrique et spectrophotométrique ne permettent pas de doser dans l'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH dont nous venons d'exploiter la grande pureté. Il semble donc que les procédés de préparation et de purification décrits par KANAMORI et KAWABATA aient fourni à ces auteurs, des préparations fortement souillées par d'autres protéides du blanc d'oeuf.

B - CONCLUSIONS.

La molécule d'ovomucoïde de masse moléculaire 26 700 contient environ 185 acides aminés dont 41 acides aminés dicarboxyliques et 24 acides ~~dicarboxyliques~~ monocarboxyliques. Elle ne contient pas de tryptophane. Si l'absence de cet acide aminé, exclut la présence dans les préparations d'ovomucoïde d'autres protéides du blanc d'oeuf, comme le lysozyme ou l'ovalbumine, elle ne peut cependant pas être considérée comme un critère sûr de pureté. L'ovoinhibiteur et l'ovoglycoprotéine que nous avons rencontrés dans les préparations selon les procédés de LINEWEAVER et MURRAY et de FORSYTHE et FOSTER sont en effet, également dépourvus de tryptophane (voir les Tableaux XII ; p.82 et XVIII ; p.133).

Les compositions centésimales en acides aminés déterminées par OSUGA et FEENEY et par nous même sont dans l'ensemble identiques. Elles sont en désaccord profond avec les déterminations de KANAMORI et KAWABATA qui ont été effectuées sur des préparations souillées par d'autres protéides du blanc d'oeuf, comme en témoignent les teneurs élevées en tryptophane trouvées par ces auteurs. Nous étayerons cette assertion dans le dernier chapitre de ce mémoire.

IV - DETERMINATION DES ACIDES AMINES N- ET C- TERMINAUX

A - RESULTATS.

1° - IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE N- TERMINAL.

La dinitrophénylation selon SANGER (531) fournit uniquement la DNP-alanine, indiquant que l'alanine est en position N- terminale. Ce résultat confirme s'il en est besoin, les conclusions de FRAENKEL-CONRAT et PORTER (532), de NOBLE et al. (533) et de OSUGA et FEENEY (534).

2° - IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE C- TERMINAL.

L'hydrazinolyse selon AKABORI et coll. (534) libère un seul acide aminé : la lysine qui se trouverait donc en position C- terminale. Aucun acide aminé n'a été caractérisé dans la fraction aqueuse d'élution des acides aminés neutres et acides sur Amberlite IRC-50.

Ces résultats viennent en contradiction avec ceux de PENASSE et al. (535) et avec ceux de TURNER et SCHMERZLER (536). Ces auteurs, en effet, ont trouvé que la fonction carboxylique libre terminale appartenait à la phénylalanine, les premiers en utilisant la méthode de FROMAGEOT et al. (537) de réduction de l'acide aminé C- terminal en l'amino-alcool correspondant, par l'hydrure double de lithium et d'aluminium, et les seconds en appliquant le procédé de SCHLACK et KUMPE ⁽⁵³⁸⁾ au thiocyanate d'ammonium. Il faut cependant préciser que NOBLE et al. (539), cherchant à vérifier, par une méthode enzymatique, les résultats de PENASSE et al., ont constaté que l'hydrolyse de l'ovomucoïde par la "carboxypeptidase" ne libérait aucun acide aminé, bien que l'enzyme ne fût pas inhibé par l'ovomucoïde d'une part et qu'il n'existât pas d'incompatibilité conformationnelle entre les deux réactants. Pour expliquer ce comportement anormal, les auteurs ont émis l'hypothèse que le groupe carboxylique de la phénylalanine pourrait être lié à une chaîne glucidique par une liaison "ester" ; ce type de liaison étant encore plus facilement réduit par le LiAlH_4 que les carboxyles libres. Aujourd'hui, cependant, il est parfaitement bien établi, depuis les travaux de MONTREUIL et coll. (540) et de MONSIGNY et al. (541) que les glycannes de l'ovomucoïde sont unis à la protéine uniquement par des liaisons de type N-(β -aspartyl)-glucosaminylaminique. Il est fort probable que les préparations enzymatiques utilisées par NOBLE et al., étaient très enrichies en carboxypeptidase A (3.4.2.1.) pour laquelle la phénylalanine en position C- terminale constitue

un substrat de choix. L'inactivité de l'enzyme reste donc à expliquer et on peut envisager trois hypothèses : l'existence d'une phénylalanine amidée ; la présence d'un pénultième résidu de proline ou d'acide aminé dicarboxylique qui diminuerait l'activité de la carboxypeptidase A ; un carboxyle libre terminal appartenant à la lysine qui n'est libéré que très lentement par l'enzyme. Si nos résultats fournis par l'hydrazinolyse sont exacts, l'hydrolyse de l'ovomucoïde par la carboxypeptidase B (3.4.2.2.) dont la spécificité d'action vis-à-vis des liaisons peptidyl-L-lysine est grande, pourrait confirmer notre point de vue. Cette vérification est actuellement en cours d'étude.

B - CONCLUSIONS.

Si l'acide aminé N-terminal a été souvent recherché et toujours identifié à l'alanine, peu d'auteurs ont étudié la nature de l'acide aminé C-terminal. Depuis que la présence de la phénylalanine à cette extrémité de la protéine a été proposée, en 1952 - 1953, aucune recherche n'est venue confirmer cette conclusion. Nous fondant sur nos résultats de l'hydrazinolyse d'une part et sur l'inactivité de la "carboxypeptidase" observée par NOBLE et al. d'autre part, nous pensons que le groupe carboxylique libre terminal pourrait appartenir à la lysine. Ce résultat qualitatif obtenu avec une seule méthode, chimique, devra être confirmé par l'application de méthodes enzymatiques en particulier et par des déterminations quantitatives.

4 - PROPRIETES BIOLOGIQUES.

I - INTRODUCTION ET METHODES APPLIQUEES.

Dans les généralités (voir p.44) nous avons vu que l'ovomucoïde n'inhibe que l'activité de la trypsine et que FEENEY, STEVENS et OSUGA (542) avaient montré que l'inhibition de la chymotrypsine par les préparations d'ovomucoïde était due à leur contamination par l'ovoinhibiteur dont nous avons étudié l'activité inhibitrice vis-à-vis de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine (voir p.84).

Afin de confirmer, de ce point de vue, la pureté de nos préparations, nous avons mesuré leur activité anti-trypsique d'une part et étudié le comportement électrophorétique des mélanges de chacun des trois enzymes avec l'ovomucoïde d'autre part.

II - RESULTATS.

A - MESURE DE L'ACTIVITE ANTI-TRYPHIQUE.

L'examen de la figure 55 (p.204) montre que 7,5 μ g d'ovomucoïde réduisent de 50 p.100 l'activité estérasiq^{ue} de 20 μ g de trypsine. En considérant, comme nous l'avons fait pour la détermination de l'activité anti-trypsiq^{ue} de l'ovoinhibiteur (voir p.88) que nos préparations enzymatiques contenaient 71 p.100 de trypsine active, nous pouvons calculer que le rapport pondéral ovomucoïde / trypsine correspondant à une inhibition théorique totale, est égal à 1,06 et le rapport molaire de combinaison à 1, pour des masses moléculaires de 26 700 pour l'ovomucoïde et de 23 800 pour la trypsine.

B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES ET L'OVOMUCOÏDE.

Les résultats précédents sont confirmés par les électrophorèses de la figure 56 (p.205).

Sur les électrophorégrammes 1 et 2 qui correspondent à des mélanges d'ovomucoïde et de trypsine dans des rapports pondéraux égaux à 0,20 et 0,25 respectivement, on voit des bandes intenses au niveau des composants de la trypsine. Les bandes anodiques témoignent en outre d'une hydrolyse partielle de l'ovomucoïde. Une tache de vitesse intermédiaire entre celles de l'enzyme et de l'ovomucoïde apparaît en 3, s'intensifie en 4, pour devenir maximum en 5, lorsque le rapport pondéral ovomucoïde / enzyme est porté à 0,33, à 0,5 et à 1 respectivement. Sur le diagramme 5, le complexe se dissocie de nouveau en un composant majeur et un composant mineur, moins cathodique ; les traces d'enzyme et d'ovomucoïde libres, confirment la présence de protéides inactifs dans la préparation enzymatique.

Les électrophorégrammes 6 et 7 ont été obtenus avec des mélanges à poids égaux d'ovomucoïde et de chymotrypsine et d'ovomucoïde et de subtilisine respectivement. L'ovomucoïde partiellement hydrolysé n'inhibe aucun des deux enzymes : les complexes inhibiteur - enzymes ne ^{se} sont en effet pas formés.

III - CONCLUSIONS.

Nos préparations d'ovomucoïde inhibent l'activité de la trypsine en formant avec elle des complexes équimoléculaires, hétérogènes en électrophorèse.

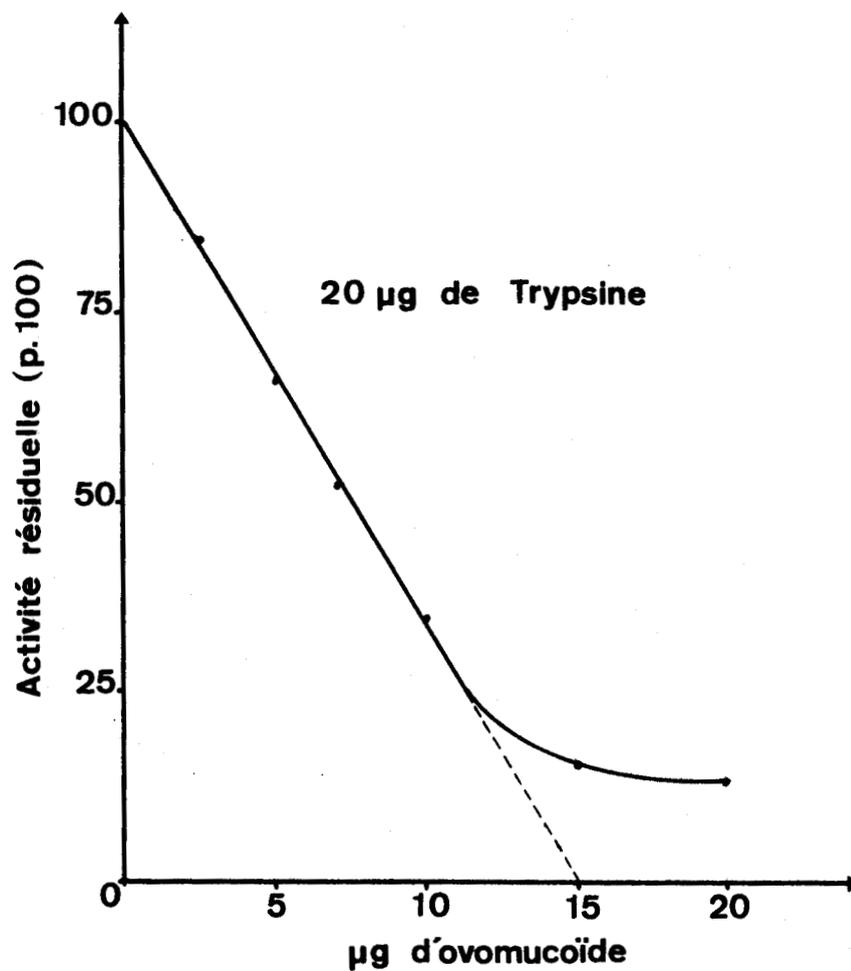


Figure 55

Activité estérasiqne de 20 µg de trypsine en présence de quantités croissantes d'ovomucoïde.

Substrat synthétique utilisé : T A M E : Tosyl arginine méthyl ester.

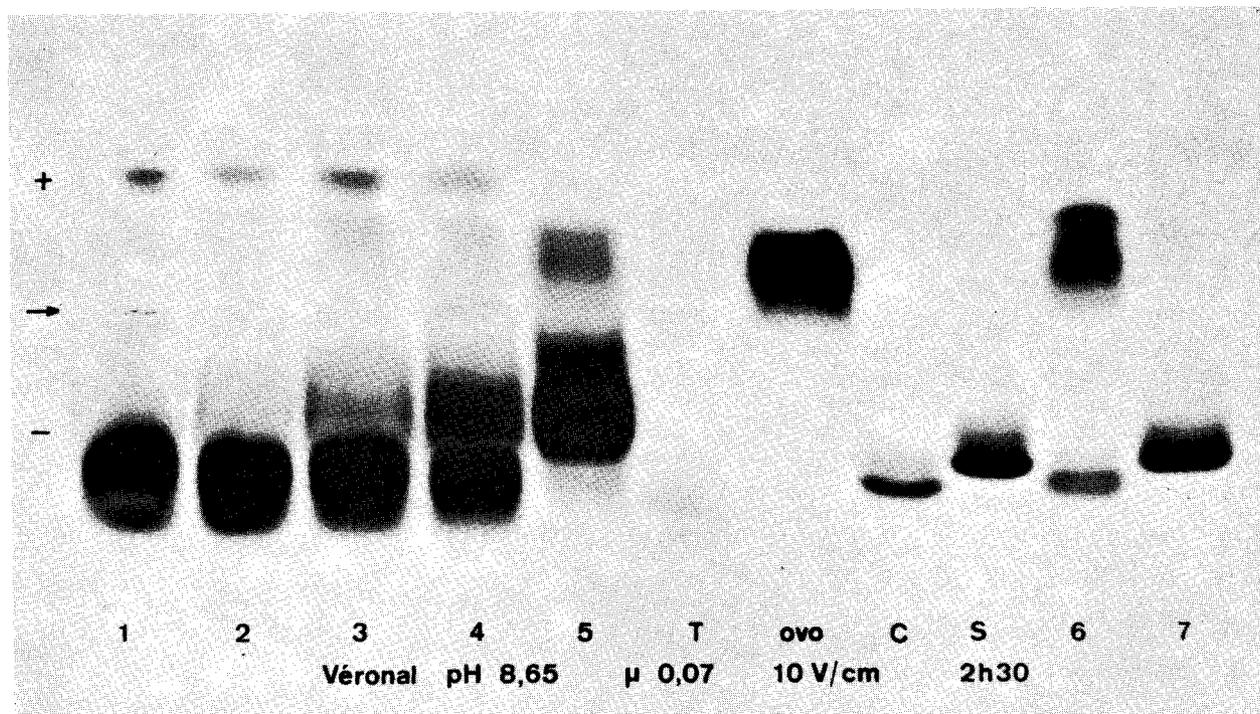


Figure 56

Electrophorèses sur acétate de cellulose de l'ovomucoïde purifié (ovo), de la trypsine (T), de la chymotrypsine (C), de la subtilisine (S), des mélanges d'ovomucoïde et de trypsine dans les rapports pondéraux 0,20 (1) ; 0,25 (2) ; 0,33 (3) ; 0,50 (4) ; 1 (5) et des mélanges à concentrations égales de l'ovomucoïde avec la chymotrypsine (6) et la subtilisine (7).

MELAMED (543) a observé un comportement semblable en étudiant en gel d'amidon les complexes formés par la trypsine et des préparations d'ovomucoïde obtenues par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY. Il est possible que la bande la plus cathodique corresponde au complexe (trypsine)₂-ovomucoïde de SRI - RAM et al. (544). Dans l'état actuel de nos travaux, il est difficile de préciser davantage la nature de cette hétérogénéité.

5 - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'ETUDE DE L'OVOMUCOÏDE.

En associant les propriétés d'une DEAE-cellulose à haut pouvoir résolutif, à l'expérience du comportement chromatographique des protéides du blanc d'oeuf que nous avons acquise en préparant l'ovoinhibiteur, l'ovoglycoprotéine et la riboflavoprotéine, nous avons pu, en une seule étape, avec un rendement de 90 p.100 environ, obtenir à partir de préparations d'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH des échantillons d'ovomucoïde homogènes en ultracentrifugation, en immuno-électrophorèse et qui n'inhibent ni la chymotrypsine, ni la subtilisine. L'utilisation combinée de la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (qui fournit le plus rapidement avec les meilleurs rendements, les préparations d'ovomucoïde les plus pures) et de notre procédé chromatographique de purification, constitue donc un moyen de préparation de l'ovomucoïde très économique.

Les propriétés physico-chimiques de l'ovomucoïde pur sont très proches de celles qui ont été déterminées sur les préparations obtenues par la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH. Notre apport original dans la connaissance de ces propriétés porte essentiellement sur deux points qui concernent l'un la fraction glycannique, l'autre la fraction protéique.

Fraction glycannique : l'ovomucoïde pur contient de l'acide sialique et nous pouvons, avec certitude, apparenter les sialoglycopeptides présents dans les hydrolysats pronasiques des préparations d'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH, à l'ovomucoïde et non à l'ovoglycoprotéine de KETTERER comme l'ont fait MONTREUIL et coll. et MONSIGNY et al.

Fraction protéique : la chaîne polypeptidique de l'ovomucoïde ne contient pas de tryptophane. D'autre part, nous contestons que l'extrémité C-terminale soit occupée par la phénylalanine ; sans apporter de preuves absolument décisives, nous pensons cependant que le carboxyle libre terminal pourrait appartenir à la lysine.

L'ovomucoïde a fait l'objet de trop nombreuses recherches physico-chimiques pour qu'il entrât dans nos intentions de les reprendre toutes, d'une

manière approfondie, dans le cadre de ce travail. Nous voulions simplement vérifier ou préciser les plus importantes d'entre elles, celles-là surtout qui devaient constituer nos éléments de référence pour l'étude de l'hétérogénéité des préparations d'ovomucoïde qui constituait le premier objectif de nos recherches, et dont nous pouvons maintenant décrire les résultats.

L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PRÉPARATIONS
D'OVOMUCOÏDE.

Dans le chapitre consacré à l'étude bibliographique (voir p.28), nous avons vu que JUTISZ et al. (545) et MONTREUIL et coll. (546) avaient montré que les préparations d'ovomucoïde contenaient plusieurs entités physico-chimiques distinctes. Notre étude des méthodes de préparation de l'ovoinhibiteur, de l'ovoglycoprotéine et de l'ovomucoïde confirme ces conclusions.

Dans le présent chapitre, nous nous proposons de conclure l'exposé de la première partie de nos recherches, en précisant la nature de ces entités et leur répartition dans les préparations d'ovomucoïde obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY, de FORSYTHE et FOSTER et de FREDERICQ et DEUTSCH. Ces procédés que nous avons appliqués, sont aussi ceux qui ont été le plus fréquemment employés par les auteurs.

1 - MATERIEL ET METHODES.

I - MATERIEL.

Les préparations d'ovomucoïde ont été obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY (ovo LM₁ et ovo LM₂) (voir p.56), de FORSYTHE et FOSTER (ovo FF) (voir p.100) et de FREDERICQ et DEUTSCH (ovo FD₁ et ovo FD₂) (voir p.189).

L'ovoinhibiteur, l'ovoglycoprotéine, la riboflavoprotéine et l'ovomucoïde ont été préparés et purifiés selon les procédés précédemment décrits.

Le lysozyme que nous avons utilisé provenait de la fraction d'élu-tion A du fractionnement chromatographique de l'"ovomucoïde" de FORSYTHE et FOSTER décrit à la page 114.

II - METHODES.

A - ANALYSES BIOLOGIQUES.

1° - Le lysozyme a été caractérisé par son activité lysante vis-à-vis d'une suspension de Micrococcus lysodeikticus. Les cellules ont été préparées au

laboratoire à partir de la souche NCTC 3665. Les cultures et les mesures de l'activité lysante ont été effectuées selon les procédés de JOLLES et coll. (547).

2° - L'inhibition de l'activité de la trypsine (3.4.4.4.), de la chymotrypsine (3.4.4.5.) et de la subtilisine (3.4.4.16.) a été déterminée par la mesure de l'activité estérasique résiduelle dans des mélanges de préparations d'ovomucoïde et d'enzyme, selon la méthode spectrophotométrique de RHODES, HILL et FEENEY (548) que nous avons employée précédemment.

3° - La capacité de fixation de la riboflavine a été déterminée par la méthode fluorimétrique de BESSEY et al. (549) selon le protocole expérimental décrit antérieurement à la page 184.

B - ANALYSES ELECTROPHORETIQUES.

Les électrophorèses ont été effectuées sur acétate de cellulose (Cellogel) avec le tampon véronal de pH 8,65 et de force ionique 0,07, sous une tension de 10 V / cm pendant 2 h 30. Après révélation par l'Amidoschwarz et transparisation par un séjour de 5 mn dans une étuve à 80°C, les électrophorégrammes ont été analysés quantitativement à l'aide d'un photomètre intégrateur - enregistreur.

C - ANALYSES IMMUNO-ELECTROPHORETIQUES.

Les immuno-électrophorèses ont été effectuées en appliquant la méthode classique de SCHEIDEGGER(550) et de GRABAR et al. (551) (552).

2 - RESULTATS.

I - ANALYSES BIOLOGIQUES.

A - CAPACITE DE FIXATION DE LA RIBOFLAVINE.

Les échantillons ovo LM₁ et ovo LM₂ d'une part et ovo FD₂ d'autre part, fixent respectivement 0,1 µg et 0,35 µg de riboflavine par mg de protéides. Ces résultats, toutefois, sont approximatifs. Au cours des étapes de la préparation de l'ovomucoïde qui comportent des précipitations à pH acide suivies de dialyses, la riboflavine peut, en effet, se détacher des flavo-protéides et augmenter ainsi leur capacité de fixation. C'est pourquoi nous

n'avons pas exploité quantitativement ces résultats pour déterminer la teneur en **flavoprotéine** des préparations d'ovomucoïde. Les échantillons ovo FF et ovo FD₁ ne contiennent pas de flavoprotéine détectable.

B - INHIBITION DE LA TRYPSINE, DE LA CHYMOTRYPSINE ET DE LA SUBTILISINE.

L'examen de la figure 57 (p.211) appelle les remarques suivantes :

1° - Les préparations obtenues par les procédés de FORSYTHE et FOSTER, de LINEWEAVER et MURRAY et de FREDERICQ et DEUTSCH inhibent la trypsine d'une manière peu différenciée : l'inactivation théorique totale de 20 µg d'enzyme serait en effet obtenue avec 21,5 µg ; 17,2 et 15 µg de protéides respectivement. On voit cependant que l'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH possède l'activité inhibitrice la plus forte et que cette dernière est identique à celle de l'ovomucoïde purifié (voir Fig. 55 ; p.204).

2° - Au contraire, les trois préparations inhibent faiblement les activités de la chymotrypsine et de la subtilisine et, pour obtenir des courbes représentatives il a fallu que nous employions des quantités d'"ovomucoïde" 100 fois plus grandes. L'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY se révèle toutefois beaucoup plus actif que les deux autres préparations, l'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH étant cette fois le moins inhibiteur. L'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY est donc, des trois préparations, le plus riche en ovoidinhibiteur qui est dans le blanc d'oeuf de Poule, l'inhibiteur de la chymotrypsine et de la subtilisine, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de ce mémoire. On remarquera en outre que la chymotrypsine est inhibée par environ deux fois plus d'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY qu'il n'en faut pour inhiber le même poids de subtilisine. Cette observation confirme les résultats que nous avons obtenus avec l'ovoidinhibiteur (voir à ce sujet notre étude de l'inhibition des enzymes par l'ovoidinhibiteur ; p.87).

C - ACTIVITE LYSANTE VIS-A-VIS D'UNE SUSPENSION DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS.

Les courbes de la figure 58 (p.212) illustrent les résultats que nous avons obtenus avec un échantillon moyen d'ovomucoïde selon FORSYTHE et FOSTER, deux échantillons d'ovomucoïde selon LINEWEAVER et MURRAY (ovo LM₁ et ovo LM₂) et un échantillon d'ovomucoïde selon FREDERICQ et DEUTSCH. On voit que les deux premiers lysent une suspension de Micrococcus lysodeikticus, de

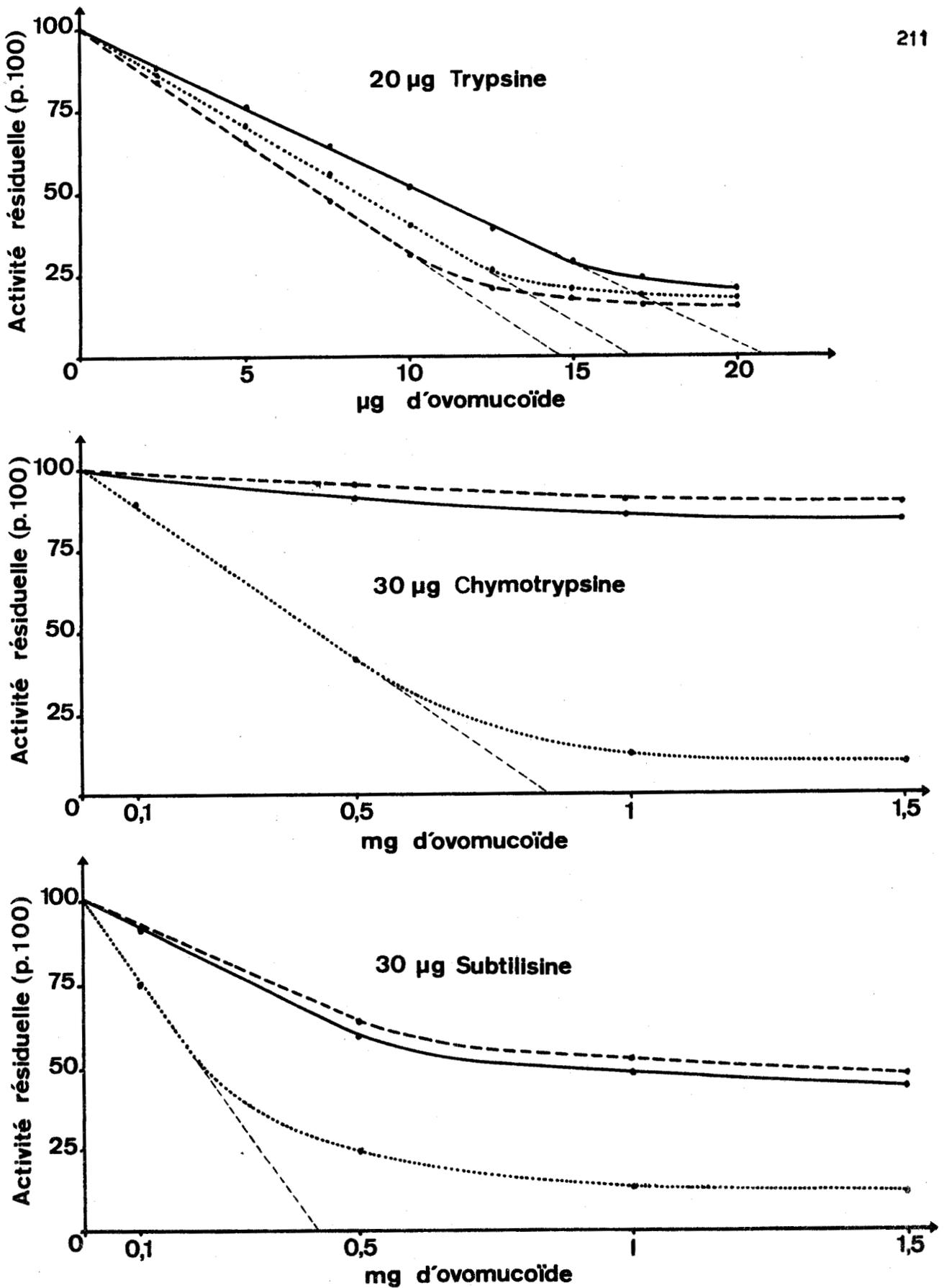


Figure 57

Activité estérasique de 20 µg de trypsine, 30 µg de chymotrypsine et de subtilisine en présence de quantités croissantes d'ovomucoïde obtenu par les procédés de FORSYTHE et FOSTER (—), de LINEWEAVER et MURRAY (.....) et de FREDERICQ et DEUTSCH (----).

Substrat synthétique utilisé : T A M E.

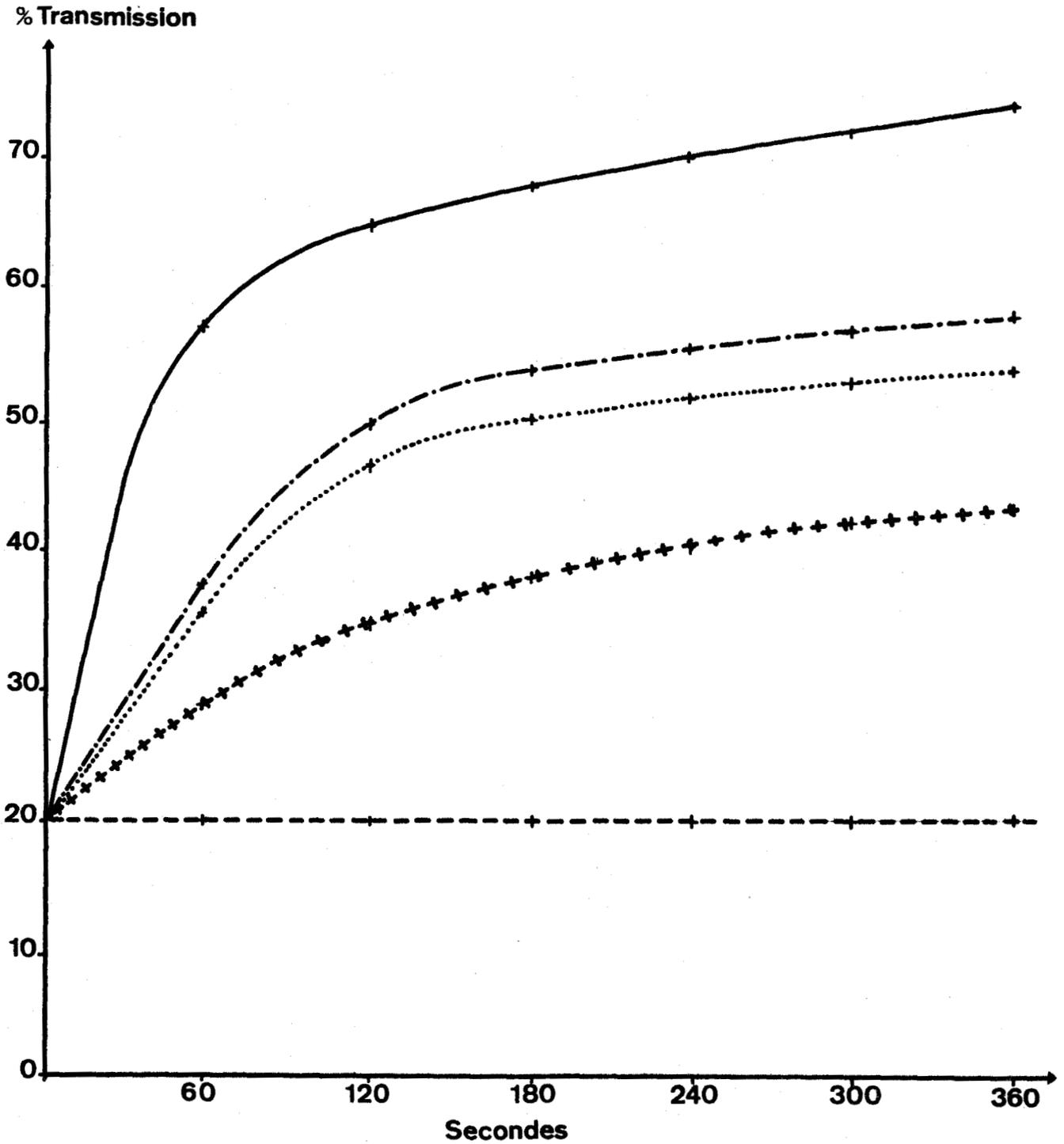


Figure 58

Lyse d'une suspension de Micrococcus lysodeikticus par le lysozyme (—) et par des préparations d'ovomucoïde obtenues par les procédés de FORSYTHE et FOSTER (· · · ·), de FREDERICQ et DEUTSCH (- - -) et de LINEWEAVER et MURRAY (ovo LM₁ - - - ; ovo LM₂ +++).

manière sensiblement identique tandis que le troisième (ovo LM₂) est moins actif et que l'"ovomucoïde" selon FREDERICQ et DEUTSCH ne possède aucune activité. Ce dernier, contrairement aux précédents, ne contient donc pas de lysozyme qui se trouve dans les préparations obtenues par le procédé de LINEWEAVER et MURRAY, en proportions variables selon les échantillons.

II - ANALYSES ELECTROPHORETIQUES.

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure 59 (p.214) et résumés dans le Tableau XXVII (p.215).

L'ovomucoïde préparé selon le procédé de LINEWEAVER et MURRAY est souillé par 5 p.100 de lysozyme, 15 p.100 d'ovoinhibiteur et 2 p.100 de flavoprotéine. Certaines préparations peuvent cependant contenir 20 p.100 à 30 p.100 de lysozyme comme c'est le cas de l'échantillon ovo LM₁. Les préparations obtenues par le procédé de FORSYTHE et FOSTER renferment outre l'ovomucoïde, 20 p.100 de lysozyme, 5 p.100 d'ovoinhibiteur et 15 p.100 d'ovoglycoprotéine ; la flavoprotéine est ici absente. Quant à l'"ovomucoïde" selon FREDERICQ et DEUTSCH (ovo FD₁), il ne montre aucun protéide contaminant. Toutefois dans certaines préparations (ovo FD₂), 5 p.100 de flavoprotéine peuvent être décelés. JUTISZ et al. (553) avaient également observé que certaines préparations obtenues par ce même procédé donnaient en électrophorèse en gélose une "tache faible migrant vers l'anode et de mobilité supérieure à celle de l'ovalbumine", mais ils n'avaient pas pu l'identifier.

III - ANALYSES IMMUNO-ELECTROPHORETIQUES.

Dans les chapitres précédents de nos travaux personnels nous avons démontré que les lignes de précipitation de comportement cathodique γ , de globuline β_3 , de globuline β_1 , de globuline α_1 et de préalbumine du blanc d'oeuf étaient celles du lysozyme (voir p.64 et 65), de l'ovoinhibiteur (voir p. 64 et 65), de l'ovomucoïde (voir p.191) et de l'ovoglycoprotéine (voir p.119 et 120) et de la flavoprotéine (voir p.146 et 147) respectivement. Nous nous proposons de comparer les diagrammes immuno-électrophorétiques des préparations obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY, de FORSYTHE et FOSTER et de FREDERICQ et DEUTSCH, afin de préciser les résultats des analyses biologiques et électrophorétiques.

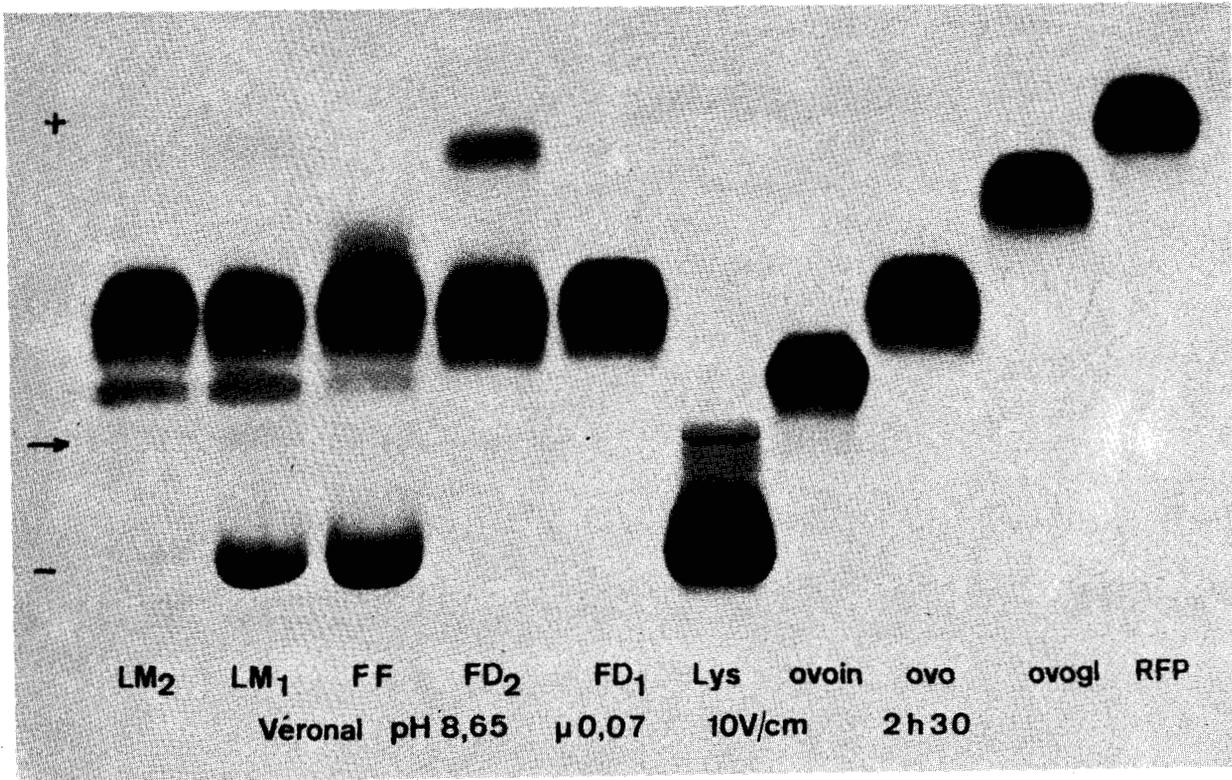


Figure 59

Electrophorèse sur acétate de cellulose des préparations d'ovomucoïde obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY (LM₁ et LM₂), de FORSYTHE et FOSTER (FF), de FREDERICQ et DEUTSCH (FD₁ et FD₂ ; voir p.190), du lysozyme (lys), de l'ovoinhibiteur (ovoin), de l'ovomucoïde (ovo), de l'ovoglycoprotéine (ovogl) et de la riboflavoprotéine (RFP).

Tableau XXVII

Proportions relatives des divers protéides présents dans les préparations d'ovomucoïde obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY, de FORSYTHE et FOSTER et de FREDERICQ et DEUTSCH.*

Procédé de préparation	lysozyme	ovoinhibiteur	ovomucoïde	ovoglycoprotéine	flavoprotéine
LINEWEAVER et MURRAY (554)	5 à 20	15	63 à 78	trace	2
FORSYTHE et FOSTER (555)	20	5	60	15	0
FREDERICQ et DEUTSCH (556)	0	0	95 à 100	trace	trace à 5

* En p. 100 des protéides totaux ; déterminations effectuées par intégration des pics des courbes d'enregistrement des électrophorégrammes de la figure 59 (p.214).

La figure 60 (p.217) représente les plaques révélées par l'Amidoschwarz après 24 heures de réaction avec le sérum anti-protéides du blanc d'oeuf. A titre de comparaison, le blanc d'oeuf a été placé dans les réservoirs n° 2, 5, 8 et 11.

Les préparations déposées dans les réservoirs n° 1, 4, 6, 9 et 14 montrent une seule ligne de précipitation, respectivement celle du lysozyme, de l'ovoinhibiteur, de l'ovoglycoprotéine, de la flavoprotéine et de l'ovomucoïde.

Les préparations d'ovomucoïde obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY, de FORSYTHE et FOSTER et de FREDERICQ et DEUTSCH donnent les diagrammes immuno-électrophorétiques n° 3, 7 et 13 respectivement. Toutes montrent plusieurs arcs de précipitation.

L'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY renferme le plus de protéides différents ; on caractérise en effet les arcs du lysozyme, de l'ovoinhibiteur, de l'ovomucoïde, de l'ovoglycoprotéine et de la flavoprotéine.

L'"ovomucoïde" selon FORSYTHE et FOSTER présente les lignes du lysozyme, de l'ovoinhibiteur, de l'ovomucoïde et de l'ovoglycoprotéine, tandis que l'on reconnaît les lignes de l'ovomucoïde, de l'ovoglycoprotéine et de la flavoprotéine sur le diagramme d'une préparation d'ovomucoïde (ovo FD₁) obtenue par le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH. Ce dernier montre en outre une ligne de globuline β_2 (arc situé à l'intérieur de celui de l'ovomucoïde) qui n'est pas constante et que nous n'avons pas pu identifier.

On remarquera d'autre part, que les lignes de la flavoprotéine présentes sur les diagrammes des "ovomucoïdes" de LINEWEAVER et MURRAY et de FREDERICQ et DEUTSCH se raccordent à leurs homologues des immuno-électrophorogrammes du blanc d'oeuf (réservoir n° 2) et de la riboflavoprotéine (réservoir n° 12).

L'immuno-électrophorèse confirme donc les résultats de l'électrophorèse et révèle une hétérogénéité encore plus grande des préparations d'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH. Ces résultats associés à ceux que nous a fournis le fractionnement chromatographique des préparations obtenues par ce dernier procédé et que nous avons décrits dans le chapitre précédent, nous permettent de considérer l'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH comme très pur et nous pouvons imputer son hétérogénéité immuno-électrophorétique à la grande sensibilité de la méthode.

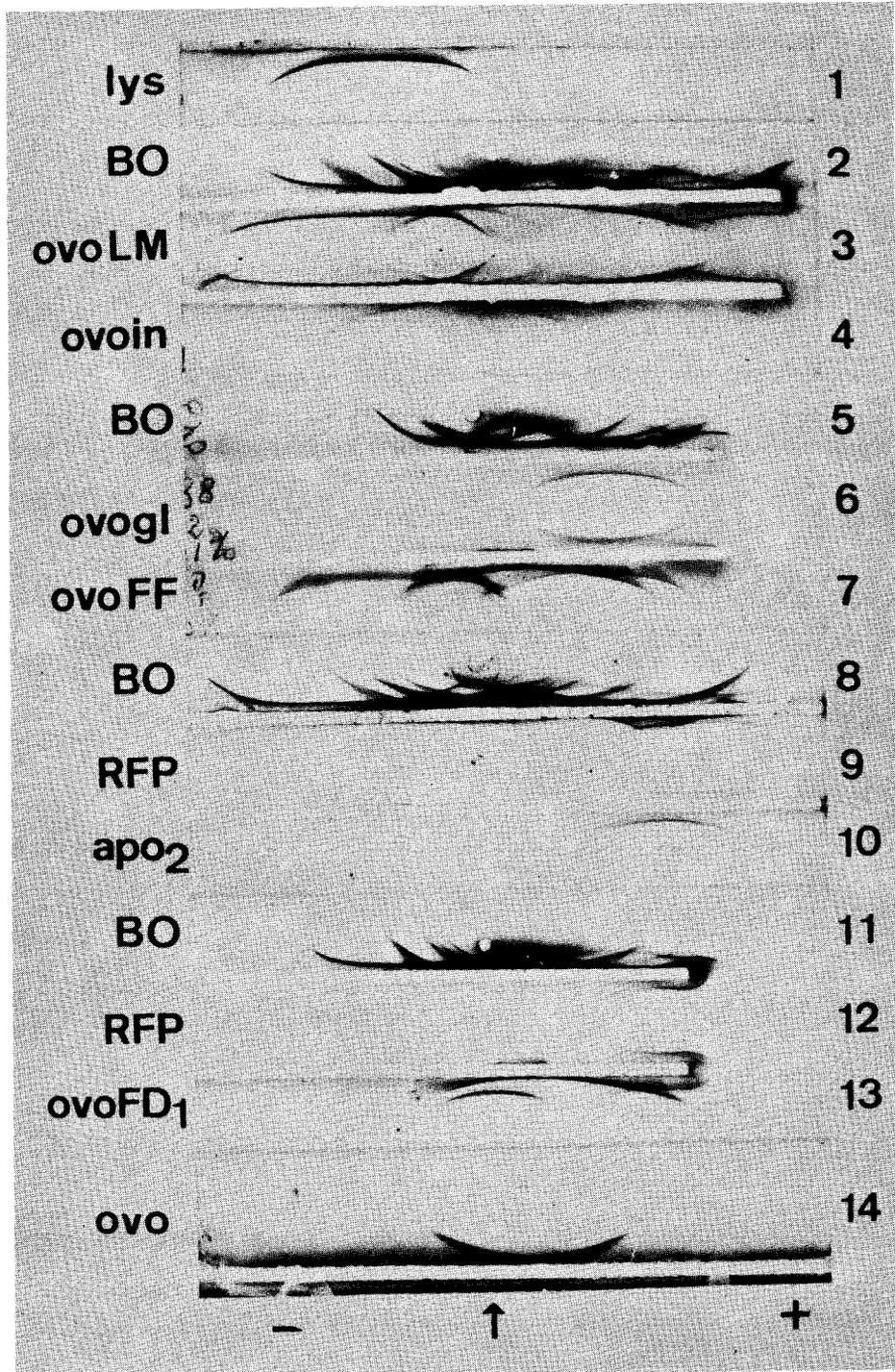


Figure 60

Immuno-électrophorégrammes en gélose (tampon véronal de μ 0,07 et de pH 8,65 ; 5 V/cm ; 2 h) du blanc d'oeuf de Poule (BO), des préparations d'ovomucoïde selon les procédés de LINEWEAVER et MURRAY (ovo LM), de FORSYTHE et FOSTER (ovo FF), de FREDERICQ et DEUTSCH (ovo FD₁), du lysozyme (lys), de l'ovoinhibiteur (ovoin), de l'ovoglycoprotéine (ovogl), de la riboflavoprotéine (RFP), de l'apoflavoprotéine 2 (apo₂) et de l'ovomucoïde (ovo).

3 - CONCLUSIONS.

L'étude de l'hétérogénéité électrophorétique et immuno-électrophorétique des préparations d'ovomucoïde nous a conduit à préparer à l'état pur les différents protéides qu'elles renferment.

En associant les résultats des analyses biologiques et électrophorétiques à ceux des analyses immuno-électrophorétiques, nous avons pu identifier sur les immuno-électrophorégrammes du blanc d'oeuf de Poule, les lignes de précipitation de la flavoprotéine, de l'ovoglycoprotéine, de l'ovomucoïde, de l'ovoinhibiteur et du lysozyme.

Les préparations d'ovomucoïde obtenues par les procédés de LINEWEAVER et MURRAY et de FORSYTHE et FOSTER contiennent 20 à 40 p.100 de protéides contaminants selon les échantillons : lysozyme, ovoinhibiteur, ovoglycoprotéine et riboflavoprotéine dans la première ; lysozyme, ovoinhibiteur et ovoglycoprotéine dans la seconde. L'ovoinhibiteur représente 15 p.100 des protéides totaux des préparations selon LINEWEAVER et MURRAY ; cette teneur explique l'inhibition de l'activité de la chymotrypsine et de la subtilisine par ces préparations et justifie leur emploi comme matériel de départ pour la préparation de l'ovoinhibiteur. Les préparations obtenues par le procédé de FORSYTHE et FOSTER contiennent 15 p.100 d'ovoglycoprotéine ; c'est pourquoi nous les avons utilisées, à la suite de KETTERER pour préparer cette glycoprotéine. Au contraire, le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH conduit le plus souvent à des préparations d'ovomucoïde très pures dans lesquelles seule l'analyse immuno-électrophorétique décèle quelques impuretés présentes à l'état de trace.

DEUXIEME PARTIE.

Hétérogénéité de l'ovomucoïde.

- Mise en évidence de l'hétérogénéité.
- Fractionnement de l'ovomucoïde.
- Etudes comparées des propriétés anti-trypsiques, physiques et chimiques des ovomucoïdes.

MISE EN EVIDENCE DE
L'HETEROGENEITE
DE L'OVOMUCOÏDE

Dans le chapitre réservé aux généralités, nous avons vu qu'au moment où nous abordions nos recherches, l'hétérogénéité de l'ovomucoïde restait très controversée en raison surtout de la méconnaissance de l'identité des divers protéides qui composaient les préparations. Après avoir élucidé le problème de l'hétérogénéité immuno-électrophorétique des préparations d'ovomucoïde et, disposant d'ovomucoïde pur, homogène en immuno-électrophorèse, nous avons repris l'étude de cette question.

1 - Les électrophorèses sur acétate de cellulose représentées à la figure 61 (p.221) révèlent sans ambiguïté, l'hétérogénéité de ce composé. Avec le tampon véronal (μ 0,07 ; pH 8,65) on caractérise deux composants O₁ et O₂ dans les proportions relatives 20 : 80 environ. Dans une solution d'acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, l'ovomucoïde se dissocie en 7 bandes dont les vitesses de migration anodique et les proportions relatives sont précisées ci-dessous :

	Désignations des bandes						
	1	2	3	4	5	6	7
Comportement anodique *	1	1,17	1,40	1,85	2,30	2,70	3,10
Proportions relatives **	20	30	25	15	5	3	2

2 - L'électrofocalisation confirme cette hétérogénéité. La figure 62 (p.222) illustre les résultats que nous avons obtenus en fractionnant 200 ng d'ovomucoïde dans une solution d'ampholytes entre pH 5 et pH 5. Nous avons pu de cette manière isoler cinq fractions A, B, C, D et E qui nous ont fourni respectivement 85 ng, 51 ng, 21 ng, 10 ng et des traces de protéides. Les quatre fractions se trouvent donc dans les proportions relatives : 50 : 30 : 12 : 5 : 3.

* Vitesse de migration relative calculée par rapport à la fraction 1.

** En p.100 des protéides totaux (déterminations effectuées par intégration des pics de la courbe de l'électrophorégramme de la figure 61 (p.221).

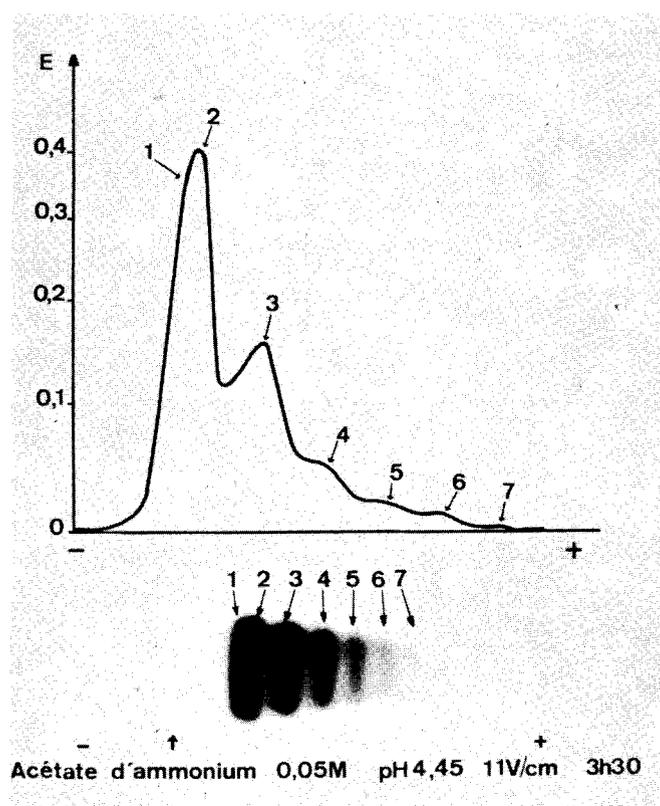
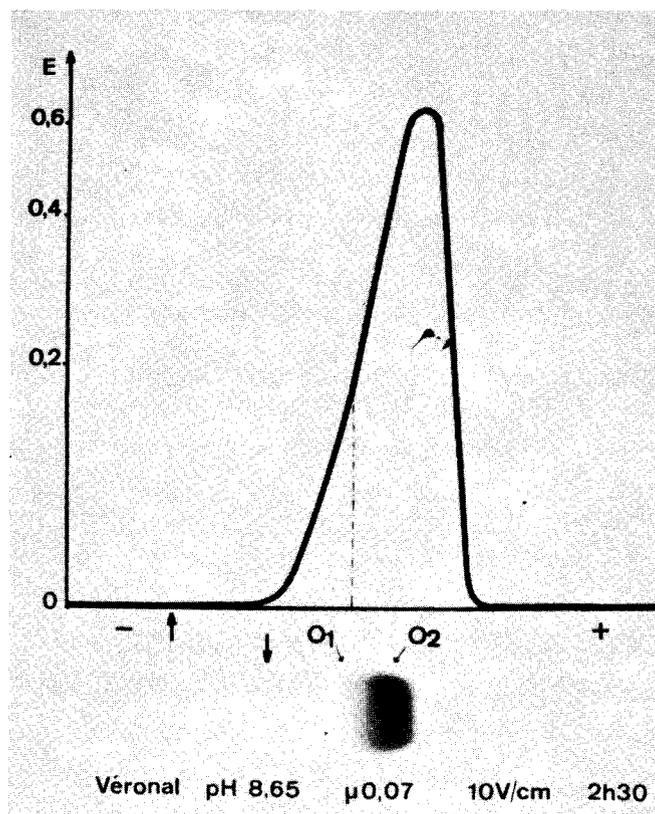


Figure 61

Electrophorèses sur acétate de cellulose de l'ovomucoïde et courbes d'enregistrement densitométrique des électrophorégrammes.

E : densité optique.

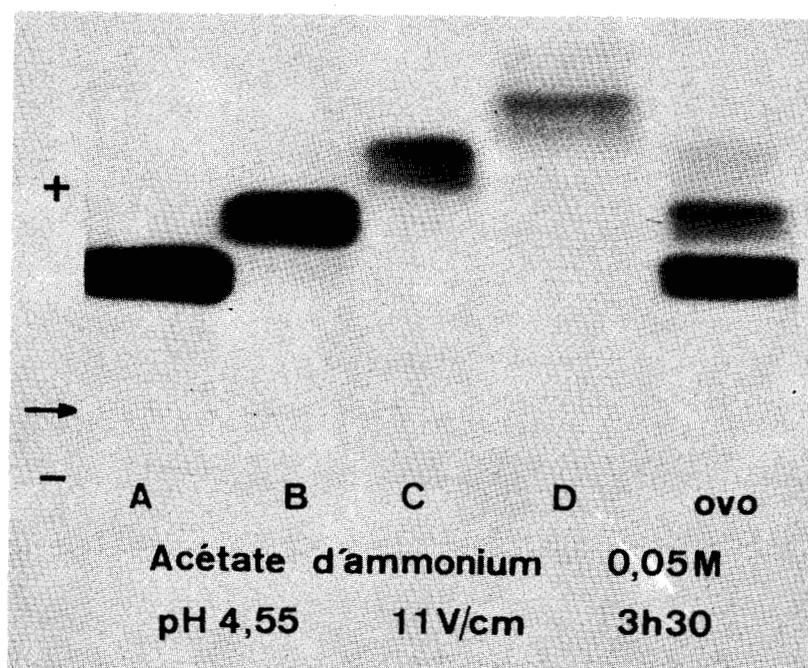
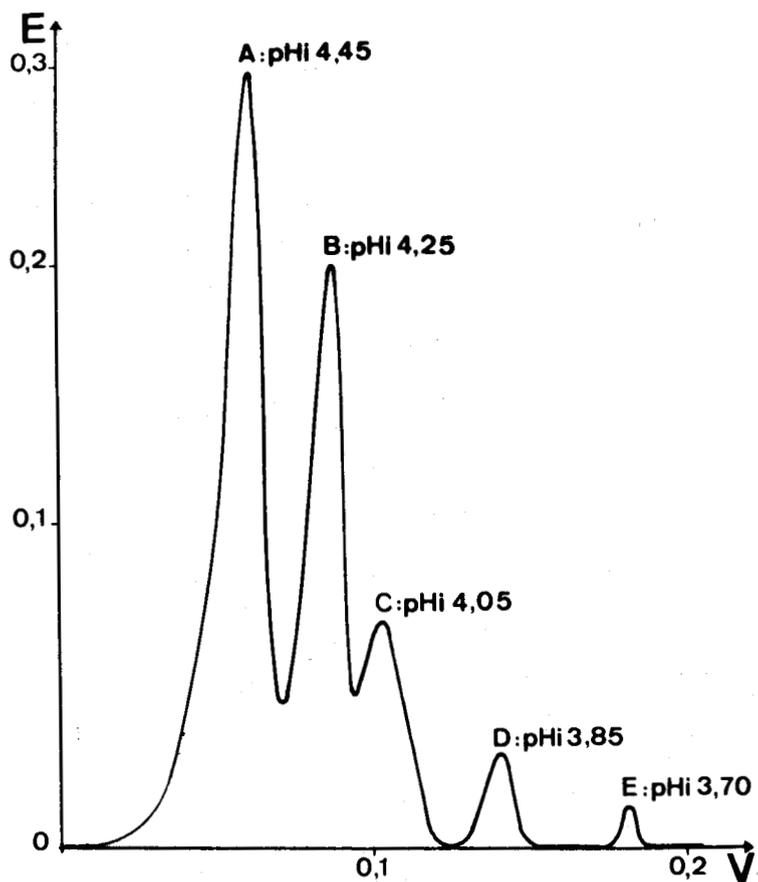


Figure 62

Fractionnement de l'ovomucoïde par électrofocalisation dans une solution d'ampholytes (gradient de pH 3 à 5) et électrophorèse sur acétate de cellulose des fractions obtenues.

E : densité optique ; V : volume des effluents exprimés en litre.

L'électrophorèse dans la solution d'acétate d'ammonium de pH 4,55, appliquée aux fractions A, B, C et D montre qu'elles sont elles mêmes hétérogènes et qu'elles correspondent aux bandes 1 + 2, 3, 4 et 5 + 6 + 7 respectivement de l'électrophorégramme direct de la figure 61 (p.221). On remarquera accessoirement la présence de taches anodiques correspondant probablement aux ampholytes non éliminés par la dialyse qui a précédé la lyophilisation. En outre, le pH des solutions correspondant au sommet des pics A, B, C, D et E est égal respectivement à 4,45 ; 4,25 ; 4,05 ; 3,85 et 3,70. Les cinq fractions diffèrent donc par leur point isoélectrique respectif.

Dans le but de préciser les raisons physico-chimiques de ces différences qui se traduisent par des comportements électrophorétiques particuliers, nous nous sommes proposé d'isoler chacun des protéides correspondant aux diverses bandes électrophorétiques que nous avons caractérisées. Pour atteindre cet objectif, nous n'avons pas retenu le procédé de fractionnement par électrofocalisation qui semble pourtant séduisant à la vue des résultats que nous venons de décrire. En effet, nous ne sommes jamais parvenu à éliminer totalement les ampholytes des solutions contenant les protéides, aussi bien par dialyse que par filtration sur gels de Sephadex diversement réticulés. En outre, notre travail avait pour mission de fournir à un autre groupe de recherches du laboratoire, des substrats de choix pour l'étude de la structure des glycoprotéines. Il fallait donc pouvoir fractionner des quantités importantes d'ovomucoïde et l'électrofocalisation ne répondait pas à cet impératif. D'autre part, au moment où nous avons pu appliquer cette méthode, la mise au point du procédé de fractionnement chromatographique de l'ovomucoïde que nous décrivons ci-après et qui nous a conduit à l'isolement de six fractions, était déjà très avancée.

Nous exposerons donc successivement, notre méthode de fractionnement de l'ovomucoïde et les résultats de l'étude comparée des propriétés anti-trypsiques, physiques et chimiques des fractions isolées.

FRACTIONNEMENT DE L'OVOMUCOÏDE

1 - PRINCIPE.

L'ovomucoïde pur est fractionné sur CM-cellulose selon un protocole expérimental analogue à celui décrit par RHODES, AZARI et FEENEY (557), pour le fractionnement des protéides du blanc d'oeuf. Les fractions obtenues sont alors sous-fractionnées sur DEAE-cellulose équilibrée avec des tampons acides.

2 - MODES OPERATOIRES.I - FRACTIONNEMENT DE L'OVOMUCOÏDE SUR CM-CELLULOSE.

3 g d'ovomucoïde sont dissous dans 30 ml d'une solution tamponnée d'acétate d'ammonium 0,1 M de pH 3,7 et la solution est soumise à la chromatographie sur une colonne de CM-cellulose* (2x40) équilibrée avec le même tampon. Le chromatogramme est développé par le passage de la solution d'équilibration à 3 pH différents : pH 3,7 ; 4,1 et 4,3. On obtient de cette manière 4 fractions. Les fractions I, II et III sont déplacées à pH 4,1 et la fraction IV, à pH 4,3. Les contenus des tubes correspondant à chaque fraction sont rassemblés, dialysés contre eau distillée et lyophilisés.

II - SOUS-FRACTIONNEMENT SUR DEAE-CELLULOSE DES FRACTIONS I, II, III et IV.A - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION I.

1 100 mg de "fraction I" en solution dans 10 ml d'acétate d'ammonium 0,005 M de pH 3,7 sont introduits dans une colonne (2x40) de DEAE-cellulose** équilibrée avec la même solution. Après le passage de 200 ml de la solution d'équilibration, les protéides sont élués avec une solution d'acétate d'ammonium 0,005 M + NaCl 0,02 M de pH 3,7.

* CM-cellulose : CM 32 WHATMAN CHROMEDIA.

** DEAE-cellulose : DE 32 WHATMAN CHROMEDIA.

B - SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS II, III et IV.

Nous avons appliqué aux trois fractions II, III et IV le même protocole expérimental de fractionnement sur DEAE-cellulose.

La cellulose échangeuse d'anions est équilibrée avec le tampon phosphate 0,005 M de pH 4,7. Des solutions de protéides à 10 p.100 sont déposées au sommet des colonnes (2x40) dans lesquelles ont fait circuler 200 ml de tampon d'équilibration avant de procéder à l'élution des protéides par le passage successif des tampons de pH 4,7 suivants : phosphate de sodium 0,005 M + NaCl 0,03 M, phosphate de sodium 0,005 M + NaCl 0,07 M, phosphate de sodium 0,005 M + NaCl 0,1 M. Les fractionnements dont nous rapportons les résultats ci-après, ont porté sur 0,850 g de "fraction II", sur 2 g de "fraction III" et sur 1,640 g de "fraction IV".

Les fractions I, II, III et IV ainsi que les diverses sous-fractions ont été soumises systématiquement à l'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose.

3 - RESULTATS.

I - FRACTIONNEMENT DE L'OVOMUCOÏDE SUR CM-CELLULOSE.

Le diagramme d'élution correspondant à un fractionnement de 3 g d'ovomucoïde sur CM-cellulose et les électrophorégrammes des fractions obtenues sont présentés à la figure 63 (p.226).

Les fractions I, II, III et IV fournissent respectivement, 0,150 g ; 0,520 g ; 0,345 g et 1,550 g de protéides et se distinguent nettement les unes des autres en électrophorèse sur acétate de cellulose.

Lorsque la migration est effectuée dans le tampon véronal, la fraction I paraît homogène, tandis que les 3 autres fractions montrent plusieurs bandes. On remarquera en particulier que la bande la moins anodique des électrophorégrammes des fractions III et IV, correspond à la fraction O₁ de l'ovomucoïde total. La fraction O₂ rassemble au contraire, toutes les autres bandes. L'emploi du tampon véronal se révèle donc très utile pour la caractérisation de l'ovomucoïde 1.

La solution d'acétate d'ammonium, qui réalise une meilleure différenciation des bandes électrophorétiques permet toutefois de voir plus

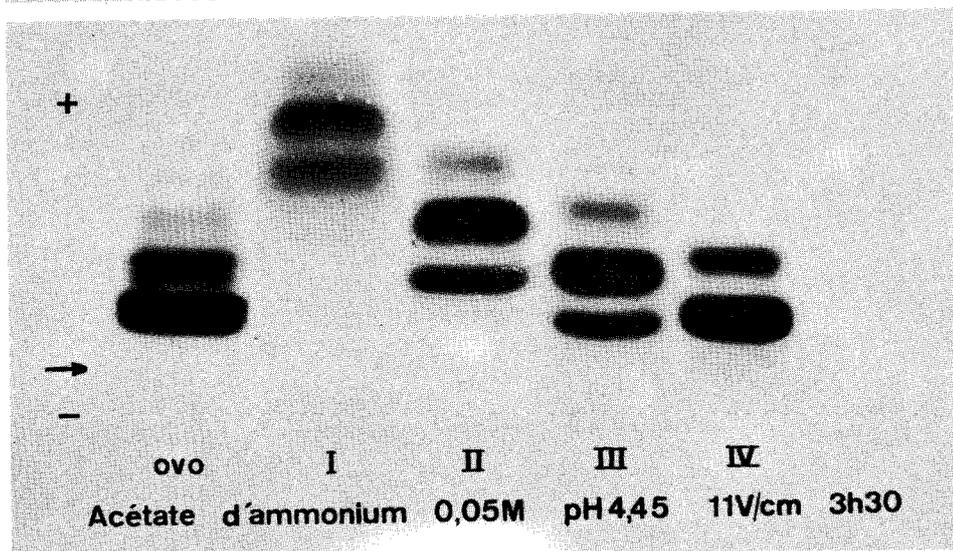
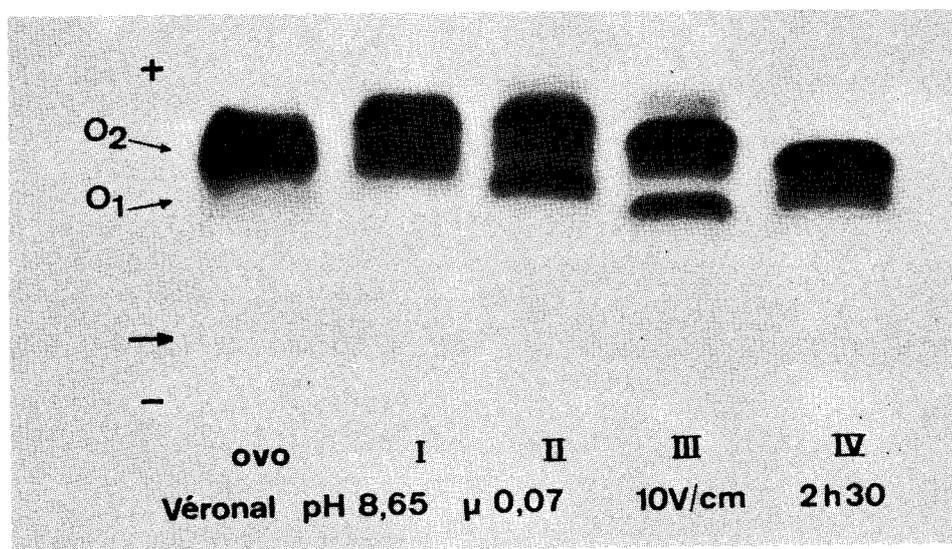
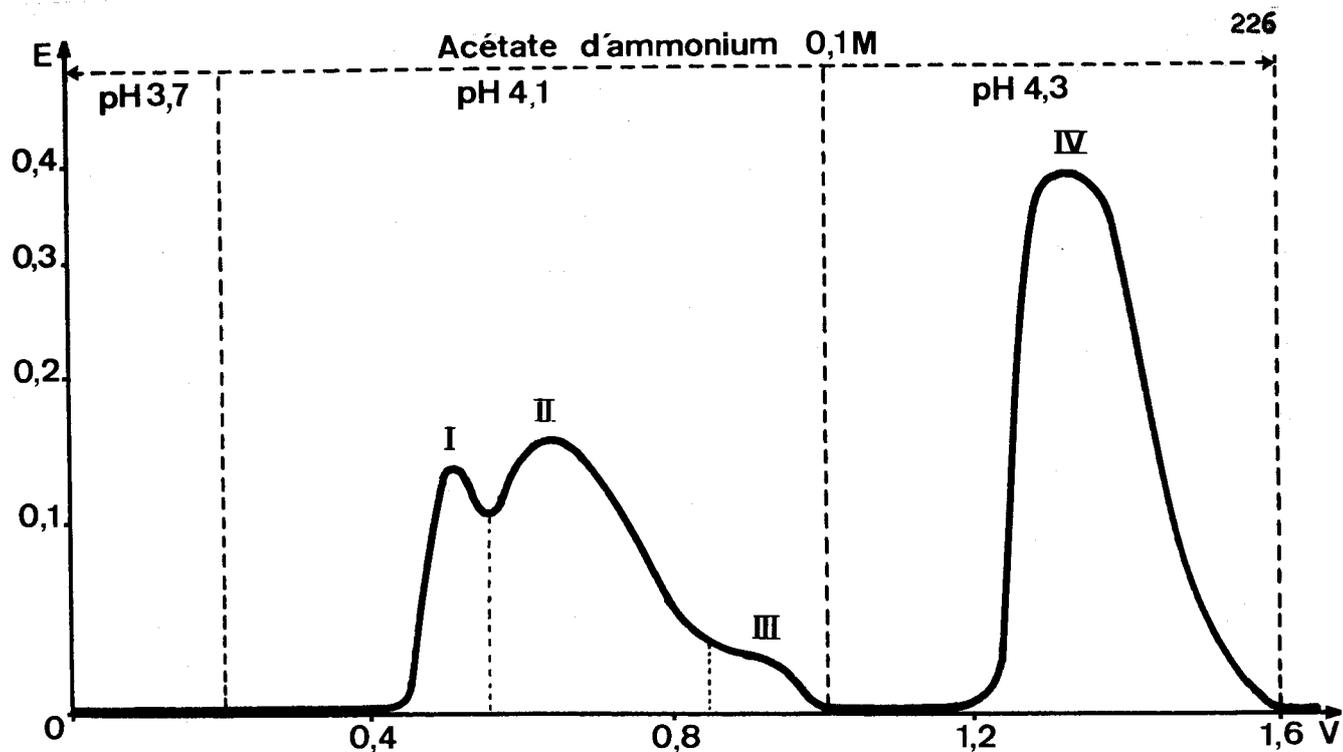


Figure 63

Diagramme d'éluion des protéides de l'ovomucoïde sur CM-cellulose et électrophorèses sur acétate de cellulose des fractions obtenues.

E : densité optique à 280 nm ; V : volume des effluents exprimé en litres.

aisément la répartition des autres ovomucoïdes dans les quatre fractions. La fraction I renferme les constituants les plus anodiques (bandes 5, 6 et 7) ; la fraction II montre la présence des bandes 3, 4 et 5 ; la bande 3 représente le composant majeur sur l'électrophorégramme de la fraction III qui révèle en outre la présence des bandes 1 et 4. Quant à la fraction IV, elle contient la totalité de l'ovomucoïde 2 élué, accompagné des ovomucoïdes 1 et 3. Dans ce dernier cas toutefois, la discrimination entre les bandes 1 et 2 est un peu plus délicate.

II - SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS I, II, III et IV, SUR DEAE-CELLULOSE.

A - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION I.

La figure 64 (p.228) montre que deux fractions Ia et Ib sont éluées avec le tampon acétate d'ammonium 0,005 M + NaCl 0,02 M de pH 3,7 et fournissent respectivement 0,677 g du mélange des ovomucoïdes 5 et 6 légèrement souillés par l'ovomucoïde 4 et 0,318 g du mélange des ovomucoïdes 6 et 7.

Ce procédé de fractionnement très imparfait n'a toutefois été retenu qu'après une étude systématique portant sur l'emploi de la CM-cellulose et de la DEAE-cellulose avec divers systèmes tampons couplés à des gradients discontinus ou continus de pH et de force ionique. L'électrophorèse préparative sur des colonnes de gel de polyacrylamide actuellement à l'étude, nous permettra peut-être de résoudre d'une manière plus satisfaisante le problème de l'isolement des ovomucoïdes 5, 6 et 7.

B - SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS II, III ET IV.

1° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION II. (Fig. 65 ; p.229 et Fig. 66 ; P.230)

850 mg de protéides ont été fractionnés et cinq fractions ont été obtenues. Les fractions IIa à IId sont éluées avec le tampon phosphate 0,005 M + NaCl 0,07 M et la fraction IIe avec le tampon phosphate 0,005 M + NaCl 0,1 M. Les fractions IIa et IId fournissent respectivement 0,272 g d'ovomucoïde 3 et 0,182 g d'ovomucoïde 4. Les fractions IIb (0,068 g) et IIc (0,169 g) contiennent la première l'ovomucoïde 3 souillé par l'ovomucoïde 4 et la seconde l'ovomucoïde 4 souillé par l'ovomucoïde 3. Le pic IIe^{ne} renferme que quelques mg d'ovomucoïde 5 ; ce rendement très faible n'a pas permis de retenir cette fraction pour les études physico-chimiques ultérieures.

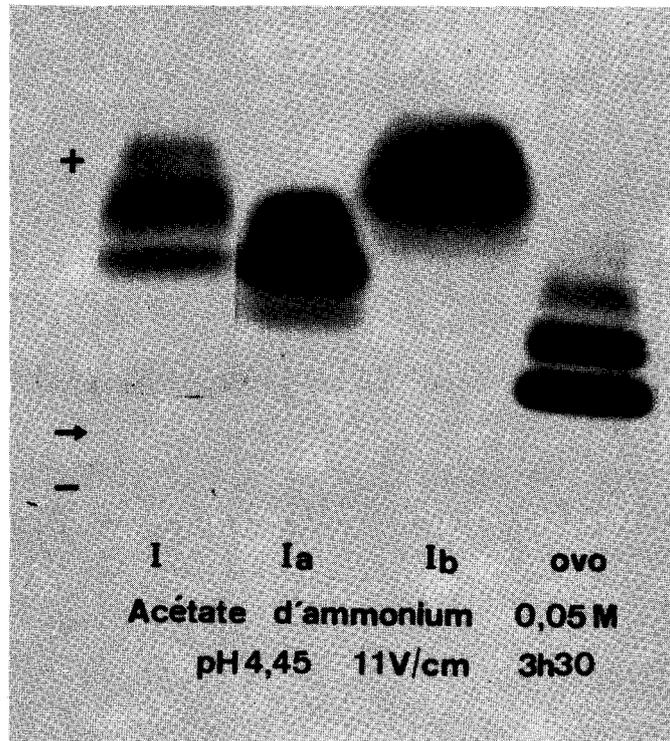
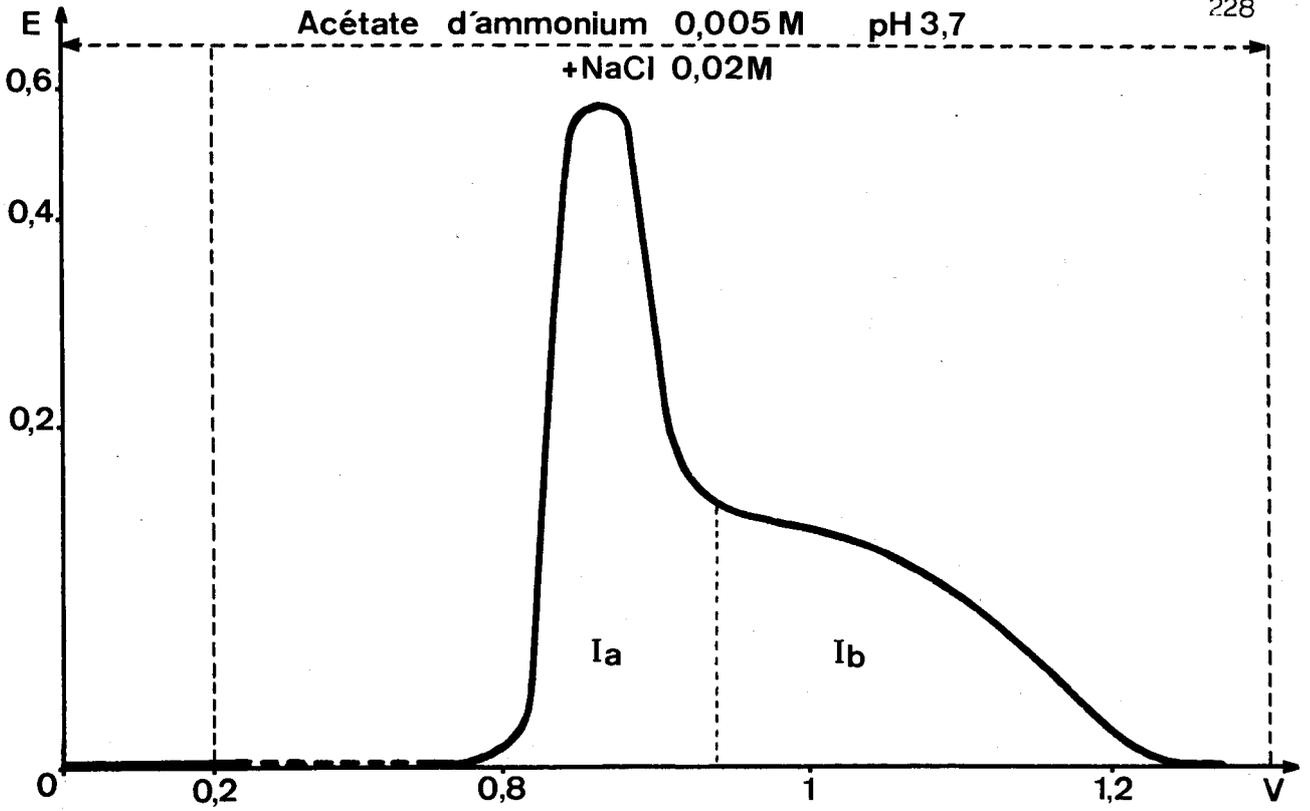


Figure 64

Diagramme d'éluion sur DEAE-cellulose de la fraction I du chromatogramme de la figure 63 (p.226) et électrophorèses sur acétate de cellulose des fractions obtenues.

E : densité optique à 280 nm ; V : volume des effluents exprimé en litres.

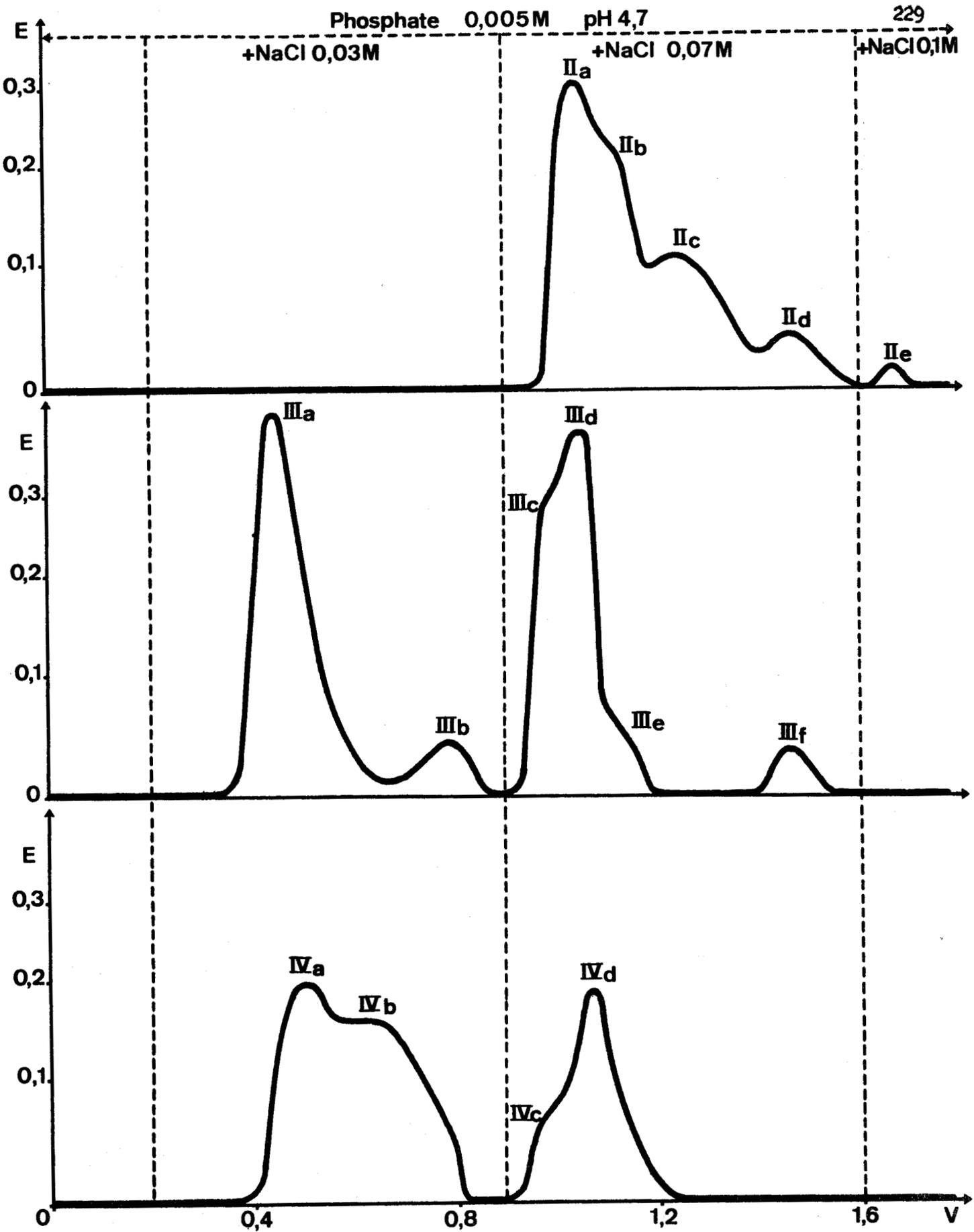


Figure 65

Chromatogrammes d'élution sur DEAE-cellulose des fractions II, III et IV obtenues par chromatographie de l'ovomucoïde pur sur CM-cellulose (voir figure 63 ; p.226).

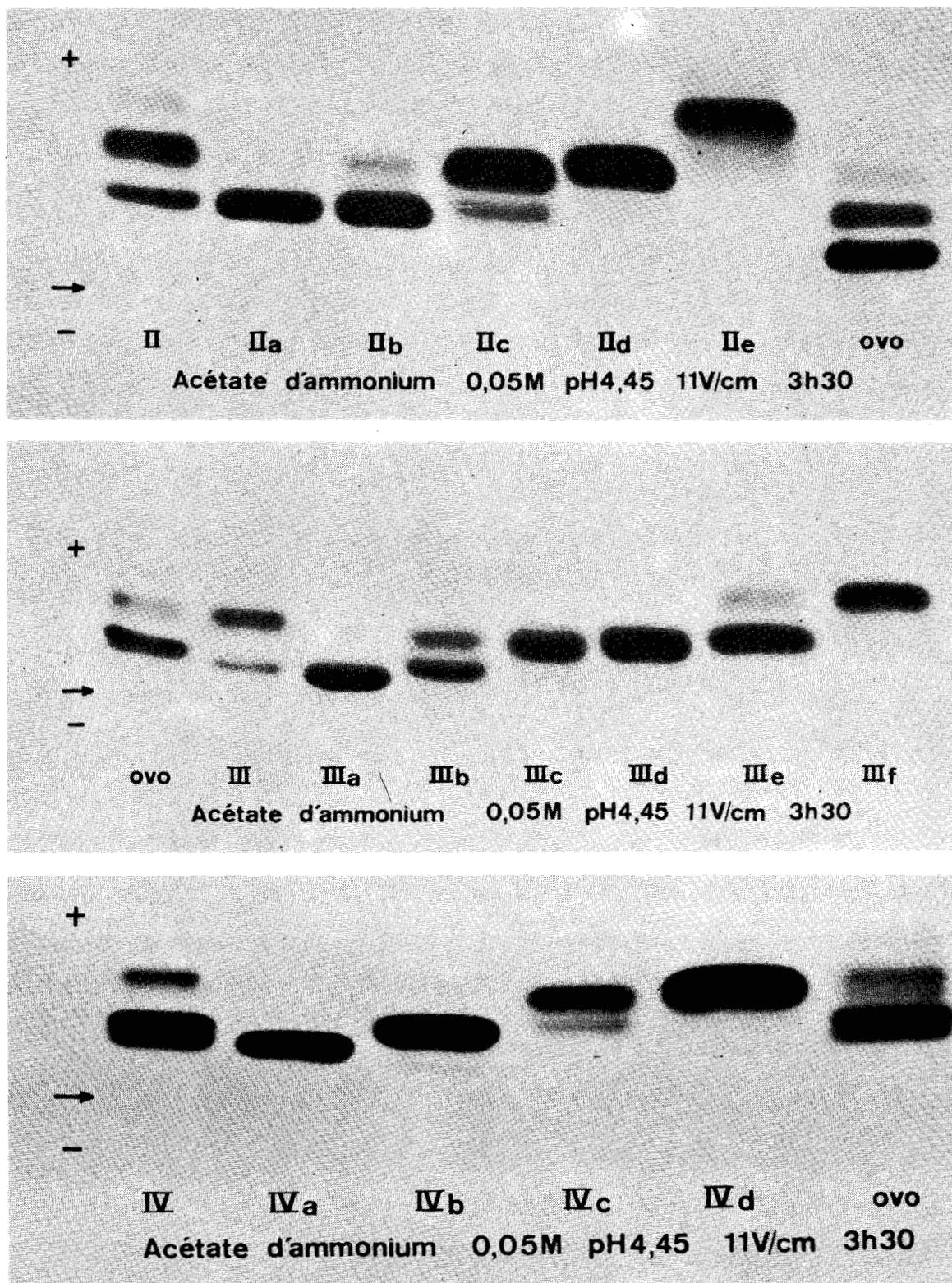


Figure 66

Electrophorèses sur acétate de cellulose des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose des fractions II, III et IV (voir les chromatogrammes de la figure précédente).

2° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION III (Fig.65 ; p.229 et Fig.66 ; p.230)

La chromatographie sur DEAE-cellulose de la fraction III conduit à 6 sous-fractions. Les deux premières sont éluées avec le tampon phosphate 0,005 M + NaCl 0,03 M et les quatre suivantes avec le tampon phosphate 0,005M + NaCl 0,07 M. Le pic IIIa contient l'ovomucoïde 1. Les fractions IIIId, IIIe et IIIf qui sont éluées dans les mêmes conditions que les fractions IIa, IIb et IIc de la chromatographie précédente renferment respectivement l'ovomucoïde 3, l'ovomucoïde 3 souillé par l'ovomucoïde 4, et l'ovomucoïde 4. L'électrophorogramme de la fraction IIIb révèle la présence des ovomucoïdes 1 et 3 en quantités sensiblement égales, tandis que les protéides de la fraction IIIc sont constitués d'ovomucoïde 3 contaminé par une trace d'ovomucoïde 1.

Les rendements de cette chromatographie sont les suivants (pour 2 g de fraction III) :

fraction IIIa	: 0,660 g
fraction IIIb	: 0,100 g
fraction IIIc	: 0,130 g
fraction IIIId	: 0,770 g
fraction IIIe	: 0,120 g
fraction IIIf	: 0,075 g

3° - SOUS-FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION IV. (Fig.65 ; p.229 et Fig.66 ; p.230)

La chromatographie sur DEAE-cellulose de 1,640 g de fraction IV fournit quatre fractions :

fraction IVa	: 0,272 g
fraction IVb	: 0,803 g
fraction IVc	: 0,233 g
fraction IVd	: 0,148 g

L'analyse électrophorétique montre que les fractions IVa, IVb et IVd contiennent les ovomucoïdes 1, 2 et 3 respectivement. Comme le pic IIIId, le pic IVd est précédé d'un "épaulement" (fraction IVc) qui contient en mélange les ovomucoïdes 2 et 3.

Des fractions identiques qui provenaient de plusieurs expériences et qui contenaient deux ovomucoïdes en mélange, ont été rassemblées et soumises à un nouveau cycle chromatographique. Les protéides ainsi préparés n'ont pas été pris en considération pour l'établissement du bilan pondéral que nous avons dressé plus loin.

4 - CONCLUSIONS.

Le fractionnement chromatographique de l'ovomucoïde pur sur CM-cellulose suivi de la chromatographie sur DEAE-cellulose des fractions obtenues nous a permis d'isoler en un cycle chromatographique les ovomucoïdes 1, 2, 3 et 4, et en mélange les ovomucoïdes 5 + 6 et 6 + 7 que nous ne sommes pas parvenu, jusqu'à présent, à fractionner d'une manière satisfaisante. La figure 67 (p.233) et le Tableau XXVIII (p.234) résument les résultats que nous avons obtenus.

Bien que les chromatogrammes ne montrent pas de pics bien isolés, leur reproductibilité était très grande, même lorsque des colonnes de CM-cellulose plus importantes (3x60) ont été utilisées pour fractionner avec le même rendement, 7 à 8 g d'ovomucoïde.

Il faut souligner enfin, que notre technique d'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose avec la solution d'acétate d'ammonium 0,05 M de pH 4,45, qui nous a permis, à chaque étape, de déterminer la composition en protéides des diverses fractions, a été déterminante dans la mise au point de ce procédé chromatographique.

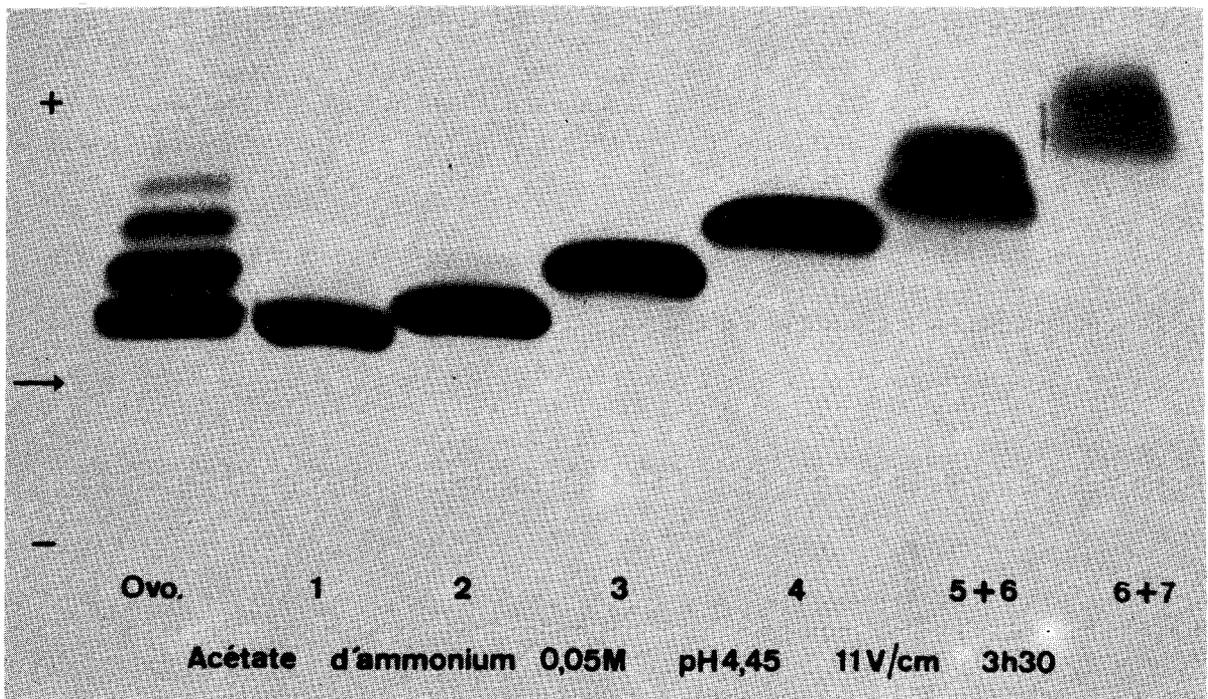
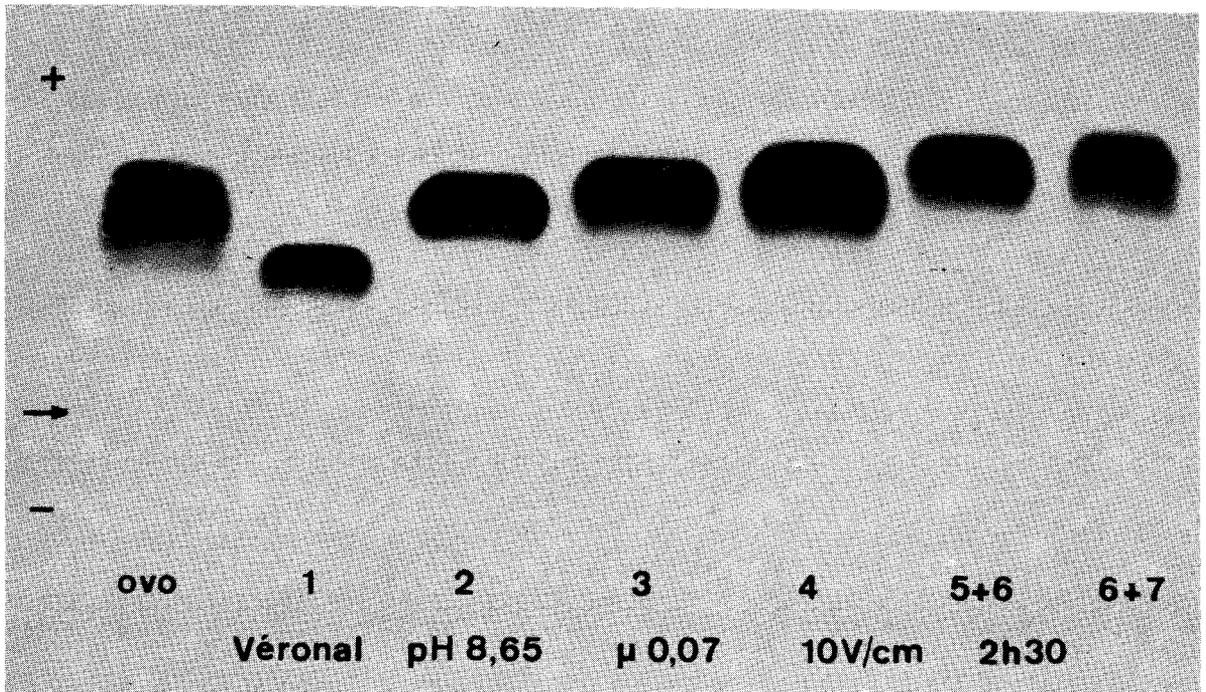


Figure 67

Electrophorèses sur acétate de cellulose des six fractions d'ovomucoïde obtenues par chromatographie de l'ovomucoïde total sur CM-cellulose et DEAE-cellulose.

Tableau XXVIII

Rendement des fractionnements de l'ovomucoïde sur CM-cellulose et DEAE-cellulose (*).

Fraction d'élution de la CM-cellulose	Chromatographie sur DEAE-cellulose					
	ovo1	ovo2	ovo3	ovo4	ovo5 + 6	ovo6 + 7
Fraction I : 0,750					0,465	0,220
Fraction II : 2,600			0,830	0,555		
Fraction III : 1,725	0,575		0,665	0,065		
Fraction IV : 7,750	1,290	3,790	0,695			
Totaux : 12,825	1,865	3,790	2,190	0,620	0,465	0,220

(*) en g pour 15 g d'ovomucoïde pur fractionné. Il n'a pas été tenu compte des ovomucoïdes obtenus par purification de certaines fractions hétérogènes : fractions IIb, IIc, IIIc et IIIe des chromatogrammes de la figure 65 (p.229).

PROPRIETES COMPAREES DES OVOMUCOÏDES

1 - PROPRIETES ANTITRYPSIQUES.

I - METHODES APPLIQUEES.

- Mesure de l'activité estérasique résiduelle de la trypsine (3.4. 4.4.) en présence de quantités croissantes de chacune des 6 fractions d'ovomucoïde.

- Etude du comportement électrophorétique des mélanges de chacune des fractions avec la trypsine.

II - RESULTATS.

A - MESURE DE L'ACTIVITE ESTERASIQUE RESIDUELLE.

Le Tableau XXIX (p.236) permet de comparer l'activité résiduelle de 20 µg de trypsine en présence de 2,5 ; 5 et 7,5 µg de chacun des ovomucoïdes. On voit que 7,5 µg des ovomucoïdes 1, 2, 3, 4, 5 + 6 et 6 + 7 réduisent l'activité de l'enzyme de 46 p.100, 54 p.100, 50 p.100, 48 p.100, 49 p.100 et 45 p.100 respectivement.

B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES COMPLEXES
OVOMUCOÏDE - TRYPSINE.

Les électrophorégrammes de la figure 68 (p.237) ont été obtenus avec des mélanges à poids égaux de chacune des fractions 1, 2, 3, 4, 5+6 et 6+7 avec la trypsine. Dans tous les cas les ovomucoïdes se sont combinés à l'enzyme pour donner des complexes dont la vitesse électrophorétique est intermédiaire entre celle de l'enzyme et celle des inhibiteurs.

Tous les complexes formés sont hétérogènes et sont constitués d'une fraction mineure et d'une fraction majeure, qui est elle même hétérogène dans le cas des ovomucoïdes 2 et 3. En outre les ovomucoïdes 5+6 et 6 +7 se distinguent des autres fractions, par la vitesse moins cathodique des complexes qu'ils forment avec la trypsine. La fraction mineure en particulier, cathodique dans les ovomucoïdes 1 à 4, reste au niveau du dépôt dans la fraction 5+6 et devient légèrement anodique dans la fraction 6+7.

Tableau XXIX

Inhibition de la trypsine par les ovomucoïdes du blanc d'oeuf de Poule *.

Désignation des ovomucoïdes	Poids d'ovo en μg	Act. enz. res.** p.100	Inhibition p.100
ovomucoïde 1	0	100	0
	2,5	86	14
	5	71	29
	7,5	54	46
ovomucoïde 2	0	100	0
	2,5	80	20
	5	65	35
	7,5	46	54
ovomucoïde 3	0	100	0
	2,5	86	14
	5	68	32
	7,5	50	50
ovomucoïde 4	0	100	0
	2,5	84	16
	5	68	32
	7,5	52	48
ovomucoïdes 5+6	0	100	0
	2,5	81	19
	5	65	35
	7,5	51	49
ovomucoïdes 6+7	0	100	0
	2,5	88	12
	5	71	29
	7,5	55	45

* Déterminations effectuées sur 20 μg de trypsine, par la méthode spectrophotométrique de RHODES, HILL et FEENEY (558).

** Act. enz. res. : activité enzymatique résiduelle.

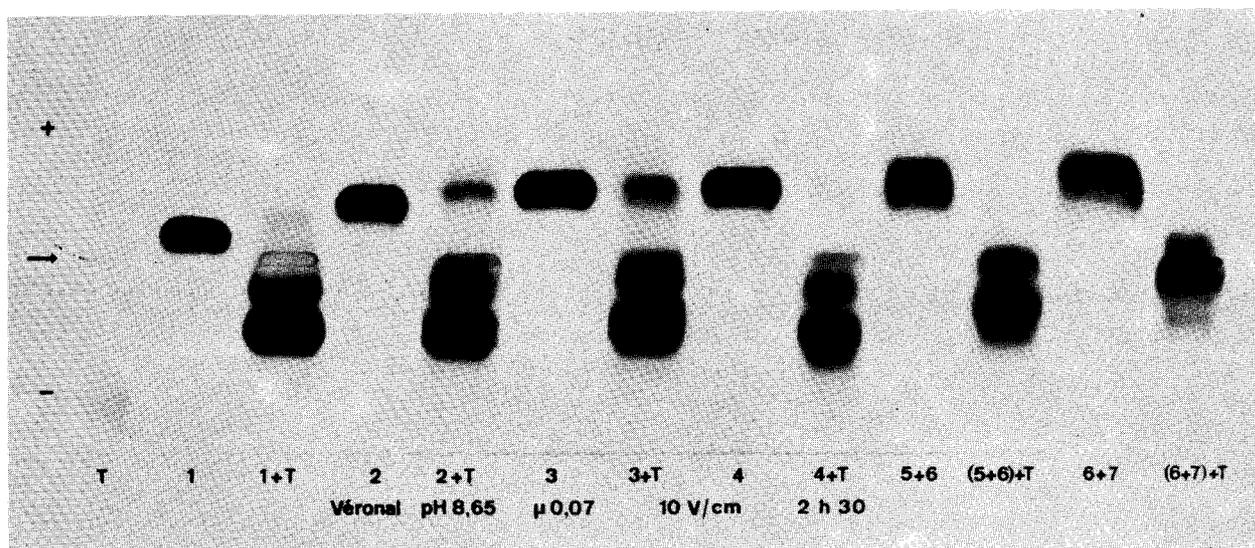


Figure 68

Electrophorèse sur acétate de cellulose de la trypsine (T), des ovomucoïdes 1, 2, 3, 4, 5 + 6 et 6 + 7 et des mélanges (rapport en poids 1:1) de chacun des ovomucoïdes avec la trypsine.

III - CONCLUSIONS.

Les six fractions d'ovomucoïde possèdent la même activité inhibitrice de la trypsine. L'étude de leur interaction avec l'enzyme confirme les résultats des mesures d'activité résiduelle. Elle révèle en outre l'hétérogénéité des complexes formés qui possèdent dans le cas des fractions 5+6 et 6+7 des vitesses moins cathodiques que dans le cas des ovomucoïdes 1 à 4.

2 - PROPRIETES PHYSIQUES.

I - METHODES APPLIQUEES.

- Immuno-électrophorèse et immuno-diffusion.
- Ultracentrifugation ; détermination des constantes de sédimentations.
- Pycnométrie : mesure des volumes spécifiques partiels.
- Spectrophotométrie d'absorption : détermination des coefficients d'extinction au maximum d'absorption dans l'ultra-violet.
- Spectropolarimétrie : détermination des pouvoirs rotatoires spécifiques.
- Electrofocalisation : détermination des points isoélectriques.

II - RESULTATS.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XXX(p239) et illustrés par la figure 69 (p.240). Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

A - IMMUNO-ELECTROPHORESE ET IMMUNO-DIFFUSION.

Des solutions, dans le tampon véronal de pH 8,65, à 10 p.100, 1 p.100 et 0,1 p.100 de chacun des ovomucoïdes ont été analysées en immuno-électrophorèse. Les plaques représentées à la figure 69 (p.240) montrent la présence d'un seul arc de précipitation correspondant à l'ovomucoïde. Les arcs obtenus avec des solutions à 10 p.100 sont tous pratiquement identiques. Au contraire les solutions à 0,1 p.100 fournissent des lignes beaucoup plus courtes et dont les vitesses anodiques croissent progressivement de la fraction 1 à la fraction 6 +7.

Tableau XXX

Propriétés physiques des ovomucoïdes du blanc d'oeuf de Poule.

	Désignation des ovomucoïdes					
	1	2	3	4	5+6	6+7
S_{20}^0 (SVEDBERG)	2,81	2,63	2,70	2,70	2,76	2,76
\bar{v} (ml / g)	0,681	0,684	0,684	0,650	0,683	0,683
$E_{278}^{1 \text{ p.100}}$ *	3,3	5	3,75	3,9	3,85	4,05
$[\alpha]_{546}^{20}$ **	-92°,3	-91°,4	-92°,7	-92°	-92°,4	-91°,1
pHi	4,45	4,40	4,21	4,05	3,92	3,72

* Déterminations effectuées sur des solutions à 0,1 g p.100 ml d'eau à pH 7.

** Déterminations effectuées sur des solutions à 1 g p.100 ml d'eau à pH 7.

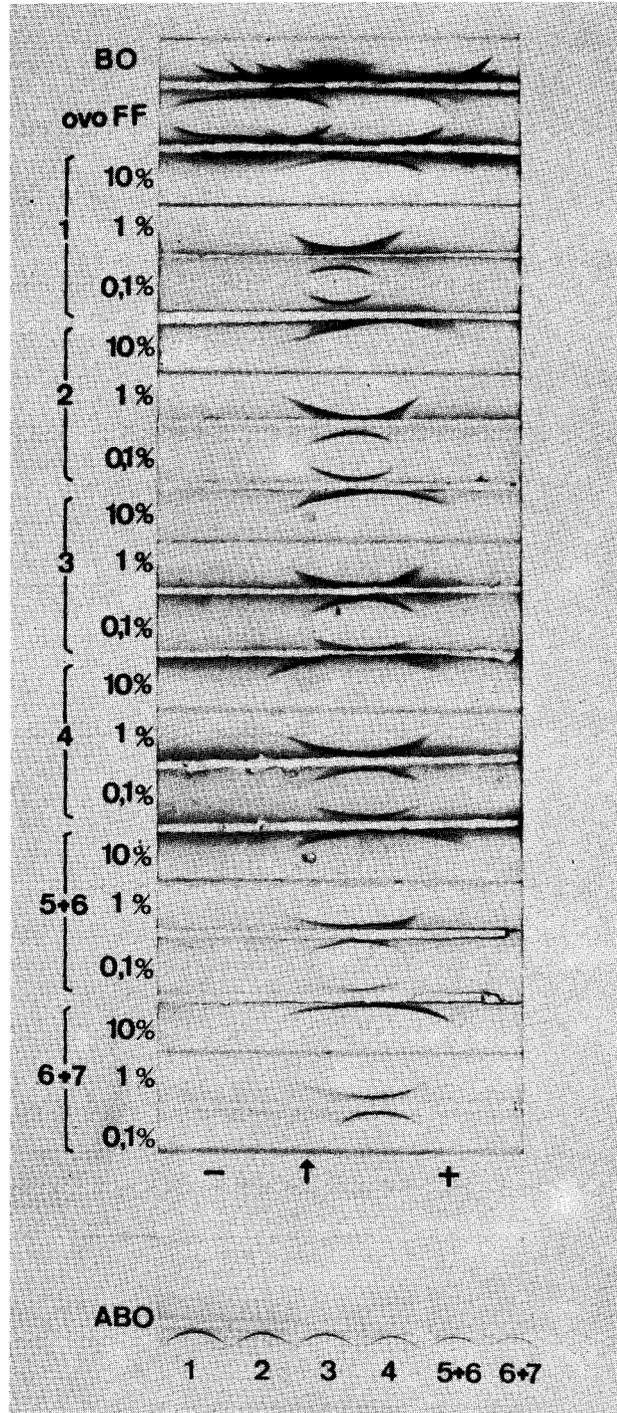


Figure 69

Diagrammes immuno-électrophorétiques du blanc d'oeuf (BO), d'une préparation d'ovomucoïde selon FORSYTHE et FOSTER (ovo FF) et des ovomucoïdes 1, 2, 3, 4, 5 + 6 et 6 + 7.

Immuno-diffusion selon OUCHTERLONY. Le raccordement parfait des arcs de précipitation sur la bissectrice d'un angle à 180° est la conséquence d'une réaction d'identité totale entre les six fractions d'ovomucoïde.

Les six fractions en solution à 10 p.100, donnent en outre des réactions d'identité totale par la méthode d'immuno-diffusion en gélose d'OUCHTERLONY.

B - ULTRACENTRIFUGATION ET VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL.

Les ultracentrifugations ont été effectuées sur des solutions à 5,10 et 15 mg de protéide par ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7.

Les six fractions sont parfaitement homogènes et possèdent des S_{20}^0 et des volumes spécifiques partiels (\bar{v}) pratiquement identiques. En outre ces valeurs sont très voisines de celles de l'ovomucoïde pur non fractionné (voir p.194) ; il ne peut donc pas s'agir de sous-unités. Les résultats de DEUTSCH et MORTON (559) d'après lesquels la rupture de tous les ponts disulfures ne modifie pas la masse moléculaire sont d'ailleurs en faveur de l'existence d'une seule chaîne peptidique dans l'ovomucoïde.

C - PROPRIETES OPTIQUES.

Les six fractions présentent un maximum d'absorption dans l'ultra-violet à 278 nm. Les coefficients d'extinction $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ des ovomucoïdes 3 à 6+7 sont très voisins et sensiblement identiques au $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ que nous avons mentionné précédemment pour l'ovomucoïde total. De ce point de vue l'ovomucoïde 1 avec la valeur la plus faible et l'ovomucoïde 2 avec la valeur la plus forte se distinguent des précédents sans que nous puissions proposer une explication à ce phénomène. Ces résultats nous permettent cependant de penser que les préparations d'ovomucoïde étudiées par CHATTERJEE et MONTGOMERY (560) dont les coefficients d'extinction $\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p.100}}$ 4,1 étaient légèrement supérieurs à ceux de nos préparations d'ovomucoïde total, ne contenaient pas la totalité des ovomucoïdes et qu'elles étaient enrichies en ovomucoïde 2.

Les pouvoirs rotatoires des six fractions sont identiques.

D - POINT ISOELECTRIQUE.

75 mg de chacune des fractions ont été analysés par électrofocalisation dans des solutions d'ampholytes permettant de réaliser un gradient de pH entre 3 et 5. Les résultats que nous avons obtenus sont, aux erreurs d'expérience près, pratiquement identiques à ceux que nous avons obtenus avec l'ovomucoïde pur total (voir p.222).

Contrairement aux autres propriétés physiques que nous avons étudiées, les points isoélectriques varient d'une préparation à l'autre et diminuent progressivement de la fraction 1 à la fraction 6+7. Ces résultats confirment

les déterminations effectuées par BIER et al. (561) en 1953 (voir les généralités ; p.30).

III - CONCLUSIONS.

Les six fractions d'ovomucoïde que nous avons obtenues sont homogènes en ultracentrifugation et en immuno-électrophorèse et montrent en immuno-diffusion des réactions d'identité totale. Elles possèdent des constantes de sédimentation, des volumes spécifiques partiels et des propriétés optiques pratiquement identiques. Au contraire, les points isoélectriques des six fractions sont distincts et varient en sens inverse de la mobilité anodique en électrophorèse.

3 - COMPOSITION CHIMIQUE.

I - METHODES APPLIQUEES.

A - ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE.

- Détermination de la composition en acides aminés.
- Identification des acides aminés N- et C- terminaux.

B - ETUDE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE.

- Détermination des compositions centésimale et molaire en glucides.
- Etude du comportement électrophorétique des hydrolysats neuraminidasiques des six fractions d'ovomucoïde.

II - RESULTATS.

A - ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE.

1° - L'examen du tableau XXXI (p.243) montre que les six fractions possèdent des compositions en acides aminés très voisines sinon identiques.

Tableau XXXI

Composition molaire en acides aminés des ovomucoïdes*1, 2, 3, 4, 5+6 et 6+7.

Nature des acides aminés	Désignation des ovomucoïdes					
	1	2	3	4	5+6	6+7
Acide aspartique	27,9	28,6	28,2	27,2	27,9	28,1
Acide glutamique	13,6	13,2	12,9	12,8	12,8	13,4
Arginine	5,5	5,8	6	6	5,8	5,7
Histidine	4,5	4,1	3,9	4,2	4,6	4,1
Lysine	14,3	13,6	14	13,4	13,6	13,6
Alanine	10,1	10,3	10,3	9,4	10,5	10
Cystine / 2	17,4	17,9	17,4	17,7	17,4	16,8
Glycocolle	14,7	15,2	14,7	15,6	14,7	14,3
Isoleucine	3,5	3,1	3,5	3,3	3,1	3,1
Leucine	11,5	11,1	11,1	11,3	11,5	10,9
Phénylalanine	4,5	4,2	4,7	4,2	4,3	4,2
Proline	9,3	9,6	9,3	10	9,3	8,6
Sérine	12,9	12,3	12,3	12,6	12,9	12,3
Thréonine	13,2	14,5	13,7	14	13	13,5
Tryptophanne	0	0	0	0	0	0
Tyrosine	6,3	6,1	6,5	6,3	6	6,2
Valine	12,9	13,4	13,5	13,2	13,4	13,4

* Pour une masse moléculaire de 26 700.

2° - L'acide aminé N- terminal a été identifié, dans tous les composés, à l'alanine par la méthode des DNP-amino-acides.

3° - L'hydrazinolyse ne libère, dans tous les cas qu'un seul acide aminé : la lysine. La constance de ce résultat semble être en faveur de la présence de la lysine à l'extrémité C- terminale de la protéine des ovomucoïdes. Nous avons discuté cette conclusion dans l'étude de la composition chimique de l'ovomucoïde pur total (voir p.201).

B - ETUDE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XXXII (p.245) et illustrés par le figure 70 (p.247).

1° - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES.

Contrairement à la composition en acides aminés, la composition en glucides varie dans de larges proportions d'une fraction à l'autre, le rapport oses "neutres" / N-acétylglucosamine en particulier de 0,55 à 0,95. En outre, la teneur en acide N-acétylneuraminique, nulle dans les ovomucoïdes 1 et 2, s'accroît progressivement dans les fractions 3 à 6+7. Les teneurs en acide N-acétylneuraminique, diffèrent toutefois, selon la méthode de dosage employée. En effet, les valeurs obtenues par la méthode d'AMINOFF, après hydrolyse par la neuraminidase selon le protocole expérimental décrit par MELAMED (562) sont inférieures dans le cas des ovomucoïdes 3, 4, 5+6 et 6+7 de 46 p.100, 50 p.100, 58 p.100 et 69 p.100 respectivement par rapport aux valeurs fournies par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN bien que les dosages aient été effectués après 15 heures d'hydrolyse et que la libération des acides sialiques ait été maximale dès la 6ème heure. Une partie importante des liaisons sialosyls semble donc résistante à l'action de la neuraminidase dans les conditions expérimentales employées du moins.

2° - COMPOSITION MOLLAIRE EN GLUCIDES.

Le rapport mannose / galactose varie de 2 à 9 selon les fractions.

A l'exception de l'ovomucoïde 2, toutes les fractions contiennent sensiblement le même nombre de résidus de mannose. Au contraire, le nombre de résidus de galactose croît graduellement dans les fractions 2 à 6+7, et c'est dans ce cas l'ovomucoïde 1 qui échappe à la règle.

Tableau XXXII

Composition centésimale et molaire * en glucides des ovomucoïdes
1, 2, 3, 4, 5+6 et 6+7.

	Désignation des ovomucoïdes					
	1	2	3	4	5+6	6+7
<u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>						
Oses "neutres"	10	7,60	9,40	9,70	11,50	11,60
N-acétylglucosamine	17	13,60	12,20	10,70	13,30	12,20
Acide N-acétylneuraminique						
Méthode de WERNER & ODIN	0	0	1,30	2	4,10	4,50
Méthode d'AMINOFF **	0	0	0,60	1	2,20	3,10
Oses "neutres" / osamine	0,58	0,55	0,77	0,90	0,85	0,95
<u>MANNOSE / GALACTOSE</u>	3	9	4,5	3,5	2,7	2
<u>COMPOSITION MOLAIRE</u>						
Galactose	4	1	2,80	3,50	5,10	6,40
Mannose	12	9	12,60	12,40	13,50	12,70
N-acétylglucosamine	22	18	16	14	20	16
Acide N-acétylneuraminique	0	0	1,20	1,85	3,50	4,10

* Pour une masse moléculaire de l'ovomucoïde de 26 700.

** Après hydrolyse par la neuraminidase.

En nous fondant sur la composition centésimale en acide sialique déterminée par la méthode à la diphenylamine d'une part et sur les proportions relatives des ovomucoïdes 5, 6 et 7 d'autre part, nous avons calculé que les ovomucoïdes 3, 4, 5, 6 et 7 pourraient renfermer respectivement 1, 2, 3, 4 et 5 résidus d'acide N-acétylneuraminique par mole.

Quant aux nombres de résidus de N-acétylglucosamine, ils ne semblent pas obéir à une loi simple.

3° - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES HYDROLYSATS NEURAMINIDASQUES.

Dans le but de préciser le rôle des résidus d'acide sialique dans la mobilité électrophorétique des sialo-ovomucoïdes, nous avons étudié leur comportement en électrophorèse sur acétate de cellulose après digestion par la neuraminidase (3.2.1.18.). La figure 70 (p.247) illustre les résultats que nous avons obtenus.

Les fractions hydrolysées sont hétérogènes et toutes montrent en proportions variables selon les fractions, deux bandes : l'une au niveau de l'ovomucoïde 2 et l'autre au niveau de l'ovomucoïde 3. On caractérise en outre, dans les fractions 4, 5+6 et 6+7 hydrolysées une bande mineure dont la vitesse est identique à celle de l'ovomucoïde 4. Enfin, l'électrophorégramme de l'hydrolysats neuraminidasique de la fraction 6+7, révèle la présence d'une fraction mineure au niveau de la bande de l'ovomucoïde 5. Les bandes 5 et 6 d'une part et la bande 7 d'autre part ont complètement disparu respectivement des électrophorégrammes des fractions 5+6 et 6+7 hydrolysées.

III - CONCLUSIONS.

1 - Les six fractions que nous avons isolées de l'ovomucoïde pur possèdent la même composition en acides aminés, des acides N- terminaux (alanine) et C- terminaux (lysine) identiques. Elles se distinguent au contraire les unes des autres par la composition centésimale en glucides, par le rapport mannose / galactose et par les nombres de résidus de galactose et d'acide N-acétylneuraminique.

2 - L'absence d'acide N-acétylneuraminique dans les ovomucoïdes 1 et 2 et le nombre de résidus d'autant plus grand que les fractions ont des vitesses anodiques plus grandes, sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'hétérogénéité électrophorétique et chromatographique de l'ovomucoïde est essentiellement liée au nombre de résidus d'acide sialique de ses constituants. L'apparition de bandes moins anodiques dans les hydrolysats neuraminidasiques des sialo-ovomucoïdes et la disparition des bandes 5, 6 et 7 dans certains d'entre eux confirment cette hypothèse.

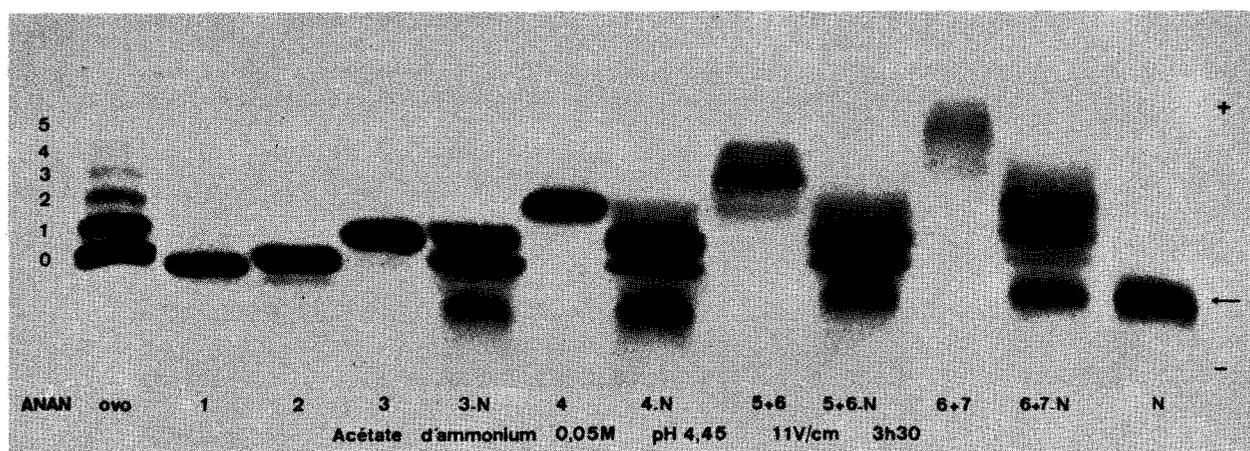


Figure 70

Electrophorèse sur acétate de cellulose de la neuraminidase (N) des fractions 1, 2, 3, 4, 5 + 6 et 6 + 7 et des fractions 3, 4, 5 + 6 et 6 + 7 hydrolysées par l'enzyme.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS CONCERNANT
L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE L'OVOMUCOÏDE

- 1 - L'électrophorèse sur acétate de cellulose avec une solution d'acétate d'ammonium de pH 4,45 et l'électrofocalisation révèlent dans l'ovomucoïde pur la présence de 7 constituants.
- 2 - La chromatographie sur CM-cellulose suivie du fractionnement sur DEAE-cellulose des fractions obtenues permettent d'isoler dans un état de pureté satisfaisant les ovomucoïdes correspondant aux bandes électrophorétiques 1, 2, 3, 4 et en mélange les ovomucoïdes 5+6 et 6+7.
- 3 - Les résultats fournis par l'étude des propriétés anti-trypsiques, immunologiques, physiques et chimiques des fractions isolées nous autorisent à conclure que les 7 constituants caractérisés sont des variants de l'ovomucoïde qui diffèrent seulement par la composition du groupement glycanique. Ils possèdent en effet des propriétés communes : S_{20w}^0 semblables, propriétés optiques analogues, activités anti-trypsiques identiques, réaction d'identité totale en immuno-électrophorèse et en immuno-diffusion, même composition en acides aminés. Ils se distinguent les uns des autres par leur point isoélectrique et par leur mobilité électrophorétique. La composition centésimale en glucides, le rapport mannose / galactose, le nombre de résidus de galactose sont caractéristiques de chaque variant. En outre, d'après la composition en acide sialique on distingue les asialo-ovomucoïdes 1 et 2 des sialo-ovomucoïdes 3 à 7. Des résultats semblables ont été décrits à propos de plusieurs glycoprotéines dont l' α_1 -glycoprotéine acide du sérum (YAMAUCHI et YAMACHINA) (563), la fétuine (OSHIRO et EYLAR) (564) et l'ovoinhibiteur (DAVIS *et al.*) (565). nous proposons d'appeler alloglyco-homoprotéine ces variants qui possèdent une protéine commune et diffèrent uniquement par leurs groupements glycaniques.
- 4 - Nos résultats sont en désaccord total avec ceux de KANAMORI et KAWABATA (566). Dans les généralités, et dans le chapitre consacré à l'étude de l'ovomucoïde pur total, nous avons vu que ces auteurs avaient étudié des préparations d'ovomucoïde dont la composition en acides aminés était très différente de celles proposées par les autres auteurs et qu'elles contenaient 1,74 p.100 de tryptophane : acide aminé dont la présence est réfutée par toutes les déterminations récentes et par les nôtres.

Le fractionnement de ces préparations sur CM-cellulose a fourni à KANAMORI et KAWABATA, 4 fractions dont nous avons précisé les propriétés physiques et la composition en glucides dans le Tableau XXXIII (p.250) et la composition en acides aminés dans le Tableau XXXIV (p.251). Les fractions I et II inhibent la trypsine tandis que les fractions III et IV seraient des "apo-protéines de flavomucoïde". Toutes cependant possèdent la même constante de sédimentation (S_{20}^0 2,50) et une masse moléculaire de 28 000 alors que nous avons montré que la constante de sédimentation de la riboflavoprotéine était voisine de 3 et sa masse moléculaire égale à 32 000 (voir p.151). Les compositions en glucides et en acides aminés des fractions III et IV sont très différentes de celles que nous avons décrites pour la riboflavoprotéine (voir les Tableaux XXI ; p.167 et XXIII ; p.176). En outre, l'acide aminé N-terminal a été identifié à la thréonine, acide aminé que KETTERER et nous même avons caractérisé à l'extrémité N-terminale de l'ovoglycoprotéine. Les fractions III et IV que les auteurs dénomment cependant ovomucoïde, semblent donc contenir au moins trois protéides du blanc d'oeuf, la riboflavoprotéine, l'ovoglycoprotéine et l'ovomucoïde. Quant aux ovomucoïdes I et II dont les compositions sont très différentes et qui contiennent respectivement 1 et 3 résidus de tryptophane par mole, ils doivent probablement aussi, être souillés par d'autres protéides du blanc d'oeuf. D'autre part leur composition en glucides suggèrent qu'ils résultent de mélanges indéfinissables de plusieurs espèces d'ovomucoïde. En effet les composition centésimales en hexoses et en osamines les apparentent à notre variant 1, tandis que les teneurs en acide sialique et le rapport mannose / galactose les rapprochent des variants 3 ou 4.

La discordance entre nos résultats et ceux de KANAMORI et KAWABATA n'est donc qu'apparente : ces auteurs ayant comparé les propriétés physico-chimiques de fractions contenant en mélange l'ovomucoïde et divers protéides du blanc d'oeuf, alors que notre étude a porté sur des variants de l'ovomucoïde pur.

5 - Les résultats de l'étude de la composition en acides sialiques des différentes fractions que nous avons isolées, associés à ceux de l'analyse électrophorétique des sialo-ovomucoïdes traités par la neuraminidase, nous permettent de conclure que l'hétérogénéité électrophorétique de l'ovomucoïde est liée au nombre de résidus d'acide sialique de ses constituants. La différence de mobilité des variants 1 et 2, qui ne contiennent pas d'acide sialique, moindre que celle qui différencie le groupe qu'ils forment et les autres variants, doit être imputée aux groupe dissociables de la protéine. Nos recherches ne nous permettent pas de préciser si cette différence de charge est due à une

Tableau XXXIII

Propriétés physiques et composition en glucides des "ovomucoïdes * I, II, III et IV" de KANAMORI et KAWABATA (567).

	Désignation des ovomucoïdes *			
	I INHIBITEURS TRYPSIQUES	II	III	IV APO-PROTEINE "DE FLAVOMUCOÏDE"
<u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>				
Constante de sédimentation **	2,43	2,50	2,49	2,55
Masse moléculaire	28 000	28 000	28 000	28 000
<u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>				
<u>EN GLUCIDES.</u>				
Hexoses	9,2	8,7	8,8	8
Glucosamine	17	15	11	5
Acide N-acétylneura- minique	1,6	1,4	0,8	0,4
<u>MANNOSE / GALACTOSE</u>	3,6	3,5	4,5	4

* Désignation des auteurs.

** Déterminations effectuées sur des solutions à 1 p.100 ; valeurs non corrigées à une dilution infinie ; tampon phosphate 0,01 M + NaCl 0,2 M de pH 7.

Tableau XXXIV

Composition molaire en acides aminés et acide aminé N- terminal des "ovomucoïdes * I, II, III et IV" de KANAMORI et KAWABATA (568).

Nature des acides aminés	Désignation des ovomucoïdes *			
	I	II	III	IV
Tryptophanne	1	3	6	5
Acide aspartique	23	16	16	14
Acide glutamique	12	26	29	24
Arginine	5	5	5	5
Histidine	4	5	7	6
Lysine	11	10	12	20
Alanine	11	14	14	10
Cystine / 2	16	11	20	16
Glycocolle	12	9	7	6
Isoleucine	4	9	9	8
Leucine	10	14	14	12
Phénylalanine	6	6	5	5
Proline	6	8	9	7
Sérine	10	18	25	20
Thréonine	12	9	8	7
Tyrosine	4	5	7	7
Valine	11	7	5	5
Acide aminé N- terminal	Alanine		Thréonine	

* Désignation des auteurs.

répartition différente dans les deux variants des groupes carboxyliques libres des acides aminés dicarboxyliques. L'hypothèse de l'existence d'un nombre différent de chaînes glycaniques (liées au groupe β carboxylique de l'acide aspartique) ne peut cependant pas être exclue ; selon les auteurs en effet, il y aurait dans l'ovomucoïde, 2 chaînes glycaniques (MONSIGNY *et al.* (569)) ou 3 chaînes glycaniques (NEUBERGER *et* PAPKOFF (570) ; MONTGOMERY *et* WU (571)).

Cette participation des groupes carboxyliques des chaînes latérales de la protéine à l'hétérogénéité de l'ovomucoïde n'est pas particulière aux ovomucoïdes 1 et 2. Récemment, nous avons observé que l'électrophorèse sur acétate de cellulose avec une solution d'acétate d'ammonium de pH 4,55 permet de dissocier les fractions 3 et 4 chacune en deux bandes qui se distinguent l'une de l'autre de la même manière que les variants 1 et 2. L'électrophorèse des fractions fournies par l'électrofocalisation (Fig.62 ; p.222) qui a été "involontairement" effectuées à pH 4,55 montre parfaitement cette hétérogénéité des ovomucoïdes 3 et 4.

Il est possible qu'une hétérogénéité semblable existe dans les ovomucoïdes 5, 6 et 7, mais qu'elle soit inapparente dans les conditions expérimentales utilisées pour les analyses électrophorétiques.

Ces résultats, associés à ceux de l'analyse électrophorétique des sialo-ovomucoïdes, après hydrolyse incomplète des liaisons sialosyls par la neuraminidase permettent de penser que les ovomucoïdes 3 à 7 sont des mélanges de plusieurs espèces d'ovomucoïde. On peut admettre qu'au sein de chacun des sialo-ovomucoïdes, tous les variants possèdent le même nombre de résidus d'acide sialique, mais qu'ils se distinguent les uns des autres par leur composition en N-acétylglucosamine et en galactose et par de faibles différences de charge imputables aux groupes dissociables de la protéine. L'ovomucoïde contiendrait donc au moins 9 variants et non pas 7.

Cette grande hétérogénéité, pourrait expliquer l'asymétrie des pics d'éluion des chromatogrammes d'ovomucoïde sur CM-cellulose et sur DEAE-cellulose et révèle l'imperfection de notre procédé de fractionnement qu'il nous faudra améliorer dans l'avenir.

Nos conclusions concernant le rôle essentiel que joueraient les acides sialiques dans l'hétérogénéité électrophorétique "macroscopique" à pH 4,45, de l'ovomucoïde sont en désaccord avec celles tirées par MELAMED (572) de l'étude de deux fractions obtenues par un fractionnement électrophorétique en gel d'amidon de l'"ovomucoïde" de LINEWEAVER *et* MURRAY.

Le comportement électrophorétique à pH 4,6 de ces deux fractions est comparable à celui de nos fractions 1 + 2 réunies (fraction lente)

et 3 (fraction rapide). La fraction rapide ne contient que 0,35 résidu d'acide sialique par mole * (notre fraction 3 en contient 1,20 résidus par mole) que l'hydrolyse par la neuraminidase libre totalement. En électrophorèse, cette fraction hydrolysée se dissocie en deux fractions. L'une (fraction Ff) conserve la vitesse de la fraction rapide, l'autre (fraction Fs) migre au niveau de la fraction lente. En se fondant sur la quantitativité de l'hydrolyse enzymatique, l'auteur a émis l'hypothèse que la fraction Ff est dépourvue d'acide sialique et que la fraction Fs en contient 1 résidu. Pour expliquer que malgré cette grande différence de charge les fractions Ff et Fs ne se dissocient pas dans la fraction rapide initiale, l'auteur a proposé trois explications possibles : 1- présence d'un carboxyl latéral de pK anormalement faible ; 2- présence d'un acide aminé basique ; 3- présence de 2 carboxyles latéraux de pK 4,6.

6 - La présence d'acide sialique dans certains variants de l'ovomucoïde, nous permet de préciser les conclusions que nous avons tirées de l'étude de l'ovomucoïde pur total et d'interpréter d'une manière différente les résultats de MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON (573) relatifs à l'origine des glycopeptides présents dans les hydrolysats pronasiques des préparations d'ovomucoïde. La composition des trois glycopeptides α_4 , β et γ isolés par ces auteurs est précisée dans le Tableau IX (généralités ; p.45). Selon une première interprétation de MONTREUIL et coll. (574) le glycopeptide α_4 qui contient de l'acide sialique provenait de sialomucoïdes comme l'ovoglycoprotéine de KETTERER, le glycopeptide β de l'ovomucoïde "proprement dit" et le glycopeptide γ d'un allo-ovomucoïde. Plus récemment, MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (575) maintenaient cette manière de voir mais considéraient le glycopeptide γ comme ^{un} artefact. Ces auteurs ont en outre isolé 10 glycopeptides qui se répartissent en 3 groupes : α_3 (2 glycopeptides), α_4 (4 glycopeptides) et β (4 glycopeptides). Dans chaque groupe, les glycopeptides se distinguent les uns des autres par la séquence en acides aminés au voisinage immédiat du point d'attache glycanne-protide. La composition molaire en glucides et en acides aminés des glycopeptides α_3 , α_4 et β est rapportée dans le Tableau XXXV (p.254). D'après nos résultats nous pouvons conclure que les glycopeptides α_3 et α_4 proviennent des sialo-ovomucoïdes 3 à 7 et les glycopeptides β des asialo-ovomucoïdes 1 et 2. La notion d'allo-ovomucoïde réapparaît donc, fondée sur de nouvelles bases expérimentales. Il est cependant impossible d'établir des corrélations plus précises entre ces deux séries de résultats en raison de la grande diversité des variants.

* Masse moléculaire 28 000.

Tableau XXXV

Composition molaire en glucides et en acides aminés des glycopeptides α_3 , α_4 et β obtenus par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH (MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL)(576).

	Désignation des glycopeptides		
	α_3	α_4	β
Galactose	1	1	1
Mannose	2	3	5
N-acétylglucosamine	5	4	10
Acide N-acétylneuraminique	0,3	1	0
Acide aspartique	1	1,14	1,15
Thréonine	-	0,66	0,85
Sérine	0,17	0,29	-

Il apparaît donc que l'étude de la structure de l'ovomucoïde, pour aboutir à des résultats plus fiables et plus facilement interprétables, ne peut plus désormais être entreprise sur les glycoprotéides totaux mais sur les variants parmi lesquels les fractions 1, 2 et 3, par leur moindre hétérogénéité, semblent être des matériaux de choix. C'est une opinion semblable qu'exprimaient CHATTERJEE et MONTGOMERY (577) dès 1962, dans la conclusion d'une de leur publication sur la structure "du polysaccharide de l'ovomucoïde".

7 - La composition molaire en glucides des fractions isolées et plus particulièrement leur composition en galactose, en mannose et en acide sialique d'une part, l'hétérogénéité des sialo-ovomucoïdes d'autre part, nous incitent à penser que les différents variants que nous avons isolés ou caractérisés constituent des étapes intermédiaires de la synthèse finale du glycanne de l'ovomucoïde.

Il est en effet séduisant d'imaginer que le variant 2, dépourvu d'acide sialique, avec son unique galactose et ses 9 mannoses serait dans l'oeuf pondu le moins achevé des ovomucoïdes. Avec quelques mannoses supplémentaires le glycanne prendrait une structure plus définitive, sur laquelle viendraient ensuite se greffer successivement 5 résidus de galactose et 5 résidus d'acide N-acétylneuraminique. L'ovomucoïde terminé serait donc le variant 7. S'il en était ainsi, en raison de l'existence de nombreux variants de compositions diverses du point de vue du nombre de galactose mais contenant tous des acides sialiques, il faudrait admettre que cette synthèse s'effectue au hasard. Les sialyl-transférases, dont la spécificité est grande non seulement vis-à-vis de l'ose qui sera transféré mais aussi vis-à-vis de l'ose accepteur et de l'ose pénultième, grefferaient un résidu d'acide N-acétylneuraminique toutes les fois que le glycanne en voie de croissance présenterait la séquence di-saccharidique terminale convenable. Toutefois, le variant 1 que la composition en oses et en osamines (4 galactoses, 22 osamines) apparente à un variant de type 5 dépourvu d'acides sialiques, trouve difficilement sa place dans ces hypothèses. En effet, l'hydrolyse des sialo-ovomucoïdes par la neuraminidase ne donne jamais l'ovomucoïde 1.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'hétérogénéité électrophorétique de l'ovomucoïde, signalée depuis 1940 par les travaux classiques de LONGSWORTH et al. a fait l'objet de nombreuses recherches qui ont abouti souvent à des conclusions contradictoires. Confirmée par les uns, infirmée par les autres, elle a reçu sa première explication rationnelle en 1964 avec les études de MONTREUIL et coll. . En appliquant l'immuno-électrophorèse à l'"ovomucoïde" préparé par les différentes méthodes alors connues, ces auteurs ont démontré que, par le terme d'ovomucoïde, on désignait en réalité un mélange de plusieurs entités physico-chimiques distinctes.

Dès lors, la solution au problème ne pouvait plus échapper aux chercheurs, et seul des difficultés techniques pouvaient encore retarder la réponse. Cet aspect pratique de la question toutefois, n'apparaissait pas simple à l'époque où nous avons entrepris nos travaux, puisqu'en 1967, MELAMED pouvait encore exprimer l'opinion générale, en écrivant que la chromatographie sur des celluloses échangeuses d'ions et la filtration moléculaire sur Sephadex étaient inaptes au fractionnement de l'"ovomucoïde".

1 - Devant l'impossibilité matérielle où nous nous trouvions d'appliquer d'autres procédés que les procédés chromatographiques et face à la nécessité de fournir à d'autres chercheurs du laboratoire, des quantités importantes de protéides purs pour les études de structure, nous avons entrepris une étude systématique des conditions d'utilisation de la CM-cellulose et de la DEAE-cellulose. Ce travail plus opiniâtre qu'original, associé à la qualité des celluloses à grande capacité d'échange dont n'avaient pas pu profiter nos prédécesseurs, et à une technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose simple mais résolutive, nous a permis d'isoler les diverses entités antigéniques dont l'analyse immuno-électrophorétique avait révélé la présence à MONTREUIL et coll. Il s'agit du lysozyme, de l'ovoinhibiteur, de l'ovoglycoprotéine, de la flavoprotéine et de l'ovomucoïde.

Nous avons mis au point des méthodes chromatographiques de purification de l'ovoinhibiteur obtenu par le procédé de TOMIMATSU et al., de la flavoprotéine préparée par la méthode de RHODES et al. et de l'ovomucoïde à partir des préparations selon FREDERICQ et DEUTSCH. En outre, toutes nos tentatives de purification de l'ovoglycoprotéine obtenue par le procédé original de KETTERER ayant échouées, nous avons décrit une méthode de préparation de cette glycoprotéine.

Les procédés que nous proposons fournissent des protéides homogènes en immuno-électrophorèse.

2 - Nous avons abordé l'étude des propriétés des glycoprotéines que nous avons isolées. Leurs principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le tableau XXXVI (p.258). Nous rappellerons les résultats les plus originaux que nous avons obtenus à propos de chacune d'entre elles.

a - L'OVOINHIBITEUR est une glycoprotéine dont les constantes de sédimentation et de diffusion sont égales respectivement à 3,85 et à 6,58 et la masse moléculaire à 48 700.

L'électrofocalisation révèle la présence de trois fractions dont les points isoélectriques sont 5,9 ; 6,2 ; 6,45 et qui correspondent probablement aux fractions A + B, C et D + E de DAVIS et al..

Le groupement glycanique dont nous avons pour la première fois identifié les oses "neutres" constitutifs au mannose et au galactose (mannose / galactose : 11) renferme une seule osamine : la N-acétylglucosamine. La présence de moins d'un résidu d'acide N-acétylneuraminique par mole suggère l'existence dans l'ovoinhibiteur d'au moins un composant majeur contenant 1 résidu d'acide sialique.

La fraction protéique monocaténaire ne contient pas de tryptophane et possède la valine en position N- terminale tandis que la lysine occupe l'extrémité C- terminale.

L'ovoinhibiteur inhibe l'activité de la trypsine, de la chymotrypsine et de la subtilisine. Il forme avec chacun des trois enzymes deux complexes dont la vitesse électrophorétique est intermédiaire entre celles des deux réactants et qui apparaissent successivement quand le rapport pondéral ovoinhibiteur / enzyme varie de 0,25 à 1.

L'analyse électrophorétique de l'interaction entre l'ovoinhibiteur et les protéinases nous a permis de montrer, en particulier, que la totalité de la préparation de subtilisine était capable de se combiner à l'ovoinhibiteur. Le rapport molaire de combinaison subtilisine / ovoinhibiteur peut être fixé à 3, alors qu'il est égal à 2 dans le cas de la trypsine et de la chymotrypsine.

b - L'OVOLYCOPROTEINE possède une constante de sédimentation S_{20}^0 2,70 , une constante de diffusion D_{20}^0 7,51 et une masse moléculaire de 27 600.

Homogène en électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 8,65 elle se comporte comme une α_1 globuline. Hétérogène à pH 4,45, elle se dissocie en 9 composants dont les points isoélectriques sont compris entre 4,46 et 3,35.

Tableau XXXVI

Propriétés physiques et chimiques de l'ovoinhibiteur, de l'ovoglycoprotéine, de la riboflavoprotéine et de l'"ovomucoïde" du blanc d'oeuf de Poule.

	Ovoïnhibiteur	Ovoglycoprotéine	Riboflavo- protéine	Ovomucoïde
S_{20}^0	3,85	2,70	2,96	2,72
D_{20}^0	6,58	7,51	7,54	7,97
\bar{v}	0,7	0,676 - 0,680	0,7	0,683
Masse moléculaire	48 700	27 600	32 000	26 700
$E_{278}^{1\text{ p.100}}$	6,25	5,55	18	3,9
$[\alpha]_{546}^{20}$	-97°,5	-65°,8	-55°,4	-92°
Composition centésimale en glucides				
Oses "neutres"	3,91	13	4,83	8
N-acétylglucosamine	3,87	13,9	8,70	13,50
Acide N-acétylneuraminique	0,26	5,9	0,90	0,93
Mannose / Galactose	11	1,75	3,5	5
Composition centésimale en tryptophane				
	0	0	5,5	0
Acide aminé N- terminal	Valine	Thréonine	néant	Alanine
Acide aminé C- terminal	Lysine	Glycocolle	Acide glutamique	Lysine

Hormis l'ovomucine, c'est de toutes les glycoprotéines actuellement isolées du blanc d'oeuf, la plus riche en acide sialique.

La protéine dont nous avons pour la première fois déterminé la composition en acides aminés ne contient pas de tryptophane et possède en position N- et C- terminale respectivement la thréonine et le glyco-colle.

L'ovoglycoprotéine n'inhibe ni la trypsine, ni la chymotrypsine, ni la subtilisine et ne forme avec ces enzymes, aucun complexe détectable en électrophorèse.

c - LA RIBOFLAVOPROTEINE possède une masse moléculaire de 32 000. Elle fixe une molécule de riboflavine par mole et déplace alors les bandes d'absorption de la riboflavine de 373 nm et 445 nm vers des longueurs d'onde plus longues. Dans le blanc d'oeuf, toutefois, 50 p.100 seulement des flavoprotéines sont combinés à la riboflavine. Ces résultats confirment ceux de RHODES et al.. Nos autres résultats, à l'exception de la détermination de la composition en acides aminés, sont originaux.

En électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 8,65 la riboflavoprotéine et l'apoflavoprotéine sont homogènes et montrent des comportements identiques de préalbumine ; à pH 4,45, elles sont hétérogènes et se dissocient en 3 et 2 bandes respectivement. La moindre hétérogénéité de l'apoflavoprotéine est probablement la conséquence d'une activité dénaturante de la CM-cellulose employée pour sa préparation.

Le point isoélectrique des 3 flavoprotéides est égal à 3,95 ; 3,85 et 3,70.

La fixation de la riboflavine sur les apoprotéines augmente leur mobilité anodique en électrophorèse à pH 4,45.

L'augmentation de plus de 50 p.100 de la lévoration quand la riboflavine est détachée de la riboflavoprotéine, implique que le noyau de l'isocalloxazine participe à un haut degré à la structure conformationnelle de la riboflavoprotéine.

La riboflavoprotéine est une sialoglyco-phosphoprotéine dont nous avons pour la première fois déterminé la composition en glucides. Elle contient 2 galactoses, 7 mannoses, 14 N-acétylglucosamines, 1 acide N-acétylneuraminique et 8 résidus "phosphoryle" par mole de masse moléculaire 32 000.

L'hydrolyse des flavoprotéides par la neuraminidase et par la phosphatase acide diminue considérablement leur vitesse anodique ; les résidus "sialyl" et "phosphoryle" sont donc responsables du comportement de pré-albumine. La libération quantitative des acides sialiques, annule totalement l'hétérogénéité électrophorétique, tandis que l'hydrolyse totale des résidus "phosphoryle "

ne l'affecte pratiquement pas. L'hétérogénéité de la flavoprotéine doit donc être essentiellement imputée aux nombres de résidus d'acide sialique de ces composants et non à des différences de composition en phosphore comme l'ont suggéré RHODES et al..

La fraction protéique est riche en acide glutamique et renferme 9 ou 10 résidus de tryptophane et 12 résidus de tyrosine par mole.

La diminution progressive du nombre de tyrosines détectables par la méthode spectrophotométrique, en fonction de la saturation des protéides en riboflavine confirme l'idée selon laquelle le noyau de l'isocalloxazine modifie considérablement la configuration spatiale de l'apoprotéine.

La flavoprotéine du blanc d'oeuf n'a pas d'acide aminé N-terminal ; la fonction carboxylique libre terminale appartient à l'acide glutamique.

La comparaison de nos résultats à ceux obtenus par OSTROWSKI et al. avec la flavoprotéine du jaune d'oeuf, révèle que les deux protéides sont physico-chimiquement distincts et que les différences concernent essentiellement la composition des groupements glycaniques.

d - L'OVOMUCOÏDE, dont nous avons pour la première fois obtenu des préparations homogènes en immuno-électrophorèse, possède des propriétés physico-chimiques très voisines de celles qui ont été décrites à propos de l'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH.

Nous avons cependant démontré que l'ovomucoïde pur contient de l'acide sialique, qu'il ne renferme pas de tryptophane et que l'acide aminé C-terminal pourrait être la lysine et non la phénylalanine comme on l'admet depuis les seules déterminations qui ont été faites en 1952 - 1953.

L'ovomucoïde ne montre aucune activité anti-chymotrypsique et anti-subtilo-peptidasique.

3 - L'étude immuno-électrophorétique des divers protéides que nous avons isolés nous a permis d'identifier sans ambiguïté 5 lignes de précipitation sur les immuno-électrophorégrammes du blanc d'oeuf : les lignes de γ -globuline cathodique, de globuline β_3 , de globuline β_1 , de globuline α_1 et de la pré-albumine respectivement au lysozyme, à l'ovoinhibiteur, à l'ovomucoïde, à l'ovoglycoprotéine et à la flavoprotéine.

4 - Nous avons appliqué l'ensemble de nos résultats à l'étude de la composition en protéides de quelques préparations d'ovomucoïde. Le procédé de FORSYTHE et FOSTER fournit des échantillons souillés de lysozyme, d'ovoinhibiteur et d'ovoglycoprotéine ; l'"ovomucoïde" de LINEWEAVER et MURRAY contient

en proportions différentes les mêmes protéides contaminants et renferme en outre de la flavoprotéine. Au contraire, la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH conduit à des préparations très pures dans lesquelles, seule l'analyse immuno-électrophorétique révèle la présence de traces d'ovoglycoprotéine et de flavoprotéine.

L'homogénéité immuno-électrophorétique doit donc être considérée comme le critère le plus sûr pour l'estimation de la pureté des préparations d'ovomucoïde. La symétrie des pics d'ultracentrifugation, l'absence de tryptophane et d'activité anti-chymotrypsique ou anti-subtilo-peptidasique, témoignent certes de préparations débarrassées de souillures massives par d'autres protéides du blanc d'oeuf ; en aucun cas toutefois, elles n'excluent la présence d'ovoglycoprotéine.

5 - L'ovomucoïde pur se dissocie en électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 4,45, en sept bandes dont la mobilité anodique croît de la bande 1 à la bande 7.

a - Le procédé de fractionnement associant la chromatographie sur CM-cellulose et sur DEAE-cellulose, applicable à des quantités importantes d'ovomucoïde (5 à 10 g), nous a permis pour la première fois d'isoler les ovomucoïdes 1, 2, 3 et 4 et en mélange, les ovomucoïdes 5+6 et 6+7.

b - L'étude comparée des propriétés anti-trypsique, immuno-électrophorétique, physiques et chimiques des 6 fractions, nous a conduit à la conclusion que les composants que nous avons caractérisés sont des variants de l'ovomucoïde.

Ils possèdent, en effet, des propriétés communes : S_{20}^0 semblables ; activités anti-trypsiques identiques ; réaction d'identité totale en immuno-électrophorèse et en immuno-diffusion ; compositions en acides aminés analogues ; même acide aminé N- et C- terminal.

Ils se distinguent les uns des autres par leur point isoélectrique et par leur mobilité électrophorétique.

La composition du groupement glycanique est caractéristique de chaque variant.

Une hétérogénéité moléculaire semblable a été décrite à propos de l'ovoinhibiteur, de la glycoprotéine α_1 sérique et de la fétuine. Nos résultats sont en faveur d'un phénomène identique dans la flavoprotéine du blanc d'oeuf et il est probable qu'il en est de même dans l'ovoglycoprotéine. Nous proposons d'appeler alloglyco-homoprotéines ces variants qui possèdent une protéine identique et des groupements glycaniques différents.

c - Les variants de l'ovomucoïde se répartissent en deux groupes différents selon leur composition en acide sialique : le groupe des asialo-ovomucoïdes 1 et 2 d'une part et le groupe des sialo-ovomucoïdes 3, 4, 5, 6 et 7 qui renferment respectivement 1, 2, 3, 4 et 5 résidus d'acide N-acétylneuraminique d'autre part.

Sur ces bases, nous proposons une interprétation différente des résultats antérieurs de MONTREUIL et coll. et de MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL concernant l'origine des glycopeptides présents dans les hydrolysats pronasiques d'"ovomucoïde" de FREDERICQ et DEUTSCH. Selon ces auteurs les glycopeptides α contenant de l'acide sialique provenaient de sialomucoïdes comme l'ovoglycoprotéine de KETTERER et les glycopeptides β dépourvus d'acide sialique de l'ovomucoïde "proprement dit". D'après nos conclusions précédentes, nous pouvons apparenter les glycopeptides α aux sialo-ovomucoïdes 3 à 7 et les glycopeptides β aux asialo-ovomucoïdes 1 et 2.

d - L'absence d'acide sialique dans les fractions électrophorétiques les plus lentes et le nombre de résidus d'autant plus grand que les vitesses anodiques sont plus grandes d'une part, la disparition de certaines bandes et l'apparition corrélative de composants de vitesse plus faible dans les hydrolysats neuraminidasiques d'autre part, impliquent que l'hétérogénéité électrophorétique de l'ovomucoïde est essentiellement liée au nombre de résidus "sialyl" de ses composants.

Les différences de charge entre les variants 1 et 2 qui ne contiennent pas d'acide sialique, doivent être imputées aux groupes dissociables de la protéine. Elles peuvent s'expliquer soit par une répartition différente des groupes β -carboxyliques libres des chaînes latérales, soit par la présence d'un nombre différent de chaînes glycaniques liées au groupe β -carboxylique des acides aspartiques. Des différences de charge semblables existeraient entre les composants révélés par l'électrophorèse à pH 4,55 dans les fractions 3 et 4. Cette hétérogénéité des variants nous conduit à fixer leur nombre dans l'ovomucoïde à 9 au moins.

e - La caractérisation de ces nombreuses espèces moléculaires, associée à la complexité croissante de la composition des fractions 2 à 7 (en galactose et en acide sialique en particulier), nous incite à émettre l'hypothèse que les différents variants que nous avons isolés ou caractérisés représenteraient des ovomucoïdes dont les glycannes seraient différemment inachevés dans l'oeuf pondu. Ils constitueraient donc des étapes intermédiaires de la biosynthèse finale du glycanne de l'ovomucoïde dont la forme la plus immature serait le variant 2 et la forme mature le variant 7.

Si cette hypothèse, qui est conforme aux connaissances que nous avons actuellement des modalités de la biosynthèse des glycoprotéines est exacte, l'étude des sécrétions de l'oviducte de la Poule pendant l'ovogénèse et l'étude des ovomucoïdes de l'oeuf en cours de formation avant la ponte, devraient permettre d'isoler des variants encore plus rudimentaires que notre fraction 2, peut-être même la protéine préformée sur laquelle nous pourrions voir se greffer la première N-acétylglucosamine.

Il est hors de doute que de telles recherches pourraient apporter des informations précieuses, non seulement pour la détermination de la structure de l'ovomucoïde mais aussi pour une meilleure connaissance des voies de la biosynthèse des glycoprotéines. Plus que jamais donc l'ovomucoïde apparaît comme le matériau de choix pour l'étude de ces composés.

B I B L I O G R A P H I E

- ADAM-CHOSSON A., Thèse Doct. Sci., Lille, (1964), (7, 9, 88, 101, 129, 136, 139, 231, 281, 326, 329, 331, 339, 341, 508)
- ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., 1965, 47, 1881, (318)
- AKABORI S., OHNO K. et MARITA K., Bull. Chem. Soc., Japan, 1952, 25, 214, (398, 534)
- ALDERTON G. et FEVOLD H.L., J. Biol. Chem., 1946, 164, 1, (175)
- ALDERTON G., WARD W.H. et FEVOLD H.L., J. Biol. Chem., 1945, 157, 43, (63)
- ALLEN R.J.L., Biochem. J., 1940, 34, 858, (496)
- AMINOFF D., Biochem. J., 1961, 81, 384, (386, 480)
- ANKIER S.I. et WEST G.B., J. Pharm. Pharmacol., 1964, 16, 129, (356)
- BAKER J.R. et BALCH D.A., Biochem. J., London, 1962, 82, 352, (39)
- BALLS A.K. et RYAN C.A., J. Biol. Chem., 1963, 238, 2976, (417bis)
- BALLS A.K. et SWENSON T.L., J. Biol. Chem., 1934, 106, 409, (92)
- BECHAMP M.A., C. R. Soc. biol., 1873, 77, 1525, (73)
- BEELEY J.G. et JEVONS F.R., Biochem. J., 1963, 88, 15, (321bis)
- BEELEY J.G. et JEVONS F.R., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 101, 133-135, (134)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., Analyst., 1954, 79, 201, (478)
- BESSEY O.A., LOWRY O.H. et LOVE R.H., J. Biol. Chem., 1949, 180, 755, (500)
- BEZKOROVAINY A. et DOHERTY D.G., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 96, 491 (436)
- BIER M., DUKE J.A., GIBBS R.J. et NORD F.F., Arch. Biochem. Biophys., 1952, 37, 491, (122, 128, 143, 147, 176, 357)
- BIER M., TERMINIELLO L., DUKE J.A., GIBBS R.J. et NORD F.F., Arch. Biochem. Biophys., 1953, 47, 465, (122, 128, 144, 148, 195, 358, 561)
- BISERTE G., Biochimie générale, 1959, 1, 892, Masson ed, Paris, (15)
- BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P., J. Chromatog., 1959, 2, 225, (397)
- BLUM J.C. et GAUDIN-HARDING F., C. R. Acad. Sci., 1966, 262, 1299, (451, 454)
- BRAGG P. et HOUGH L., Biochem. J., 1961, 78, 11, (145, 151, 228, 245, 274, 280, 316)

- CHATTERJEE A.K., et MONTGOMERY R., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 99, 426,
(135, 219, 221, 247, ²⁷⁷278, 322, 513, 518, 523, 560, 577)
- CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 46, 1881, (315)
- CHOSSON A., MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., C. R. Acad. Sci., 1962, 255, 3261,
(282)
- COHN E.J., BARNES B.A., BROWN R.K., DESROUAUX G., GILLESPIE J.M., GURD F.R.N.,
KAHNT F.W., LEVER W.F., LIU C.M., MITTELMAN D., MOUTON R., SCHMIDT K.,
SURGENOR D.M. et UROMA B., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 465, (112)
- COHN E.J. et EDSALL J.T., Proteins, Amino-acids and peptides as ions and dipolar
ions, Reinhold, New York, 1943, (434)
- CORIN G. et BERARD E., Bull. Acad. Roy. Belg., 1888, 15, 617, (79)
- DATE J.W., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1958, 10, 149 et 444, (484)
- DAVIS J.G., ZAHNLEY J.C. et DONOVAN J.W., Biochemistry, 1969, 8, 2044, (58,
377ter, 378, 380, 387, 394, 395, 402, 410, 413, 414, 565)
- DELEZENNE C. et POZERSKI E., Compt. rend. Soc. Biol., 1903, 55, 935, (90)
- DESNUELLE P., The Enzymes, 2nd Ed., BOYER, LARDY and MYRBACH (Academic press)
1960, 4, 124, (405)
- DEUTSCH H.F. et MORTON J.I., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 64, 19, (353)
- DEUTSCH H.F. et MORTON J.I., Arch. Biochem. Biophys., 1961, 93, 654, (189, 291,
299, 310, 559)
- DIXON A.S.J., Biochem. J., 1955, 60, 165, (240)
- DUPONT P., D.E.A. Biochimie, Lille, 1969, (319, 325)
- EAKIN R.E., SNELL E.E. et WILLIAMS R.J., J. Biol. Chem., 1943, 140, 535, (50)
- EDSALL J.T., in "The Proteins" (NEURATH H. and BAILEY K., eds), Vol. 1, Part B,
p. 563 Academic Press, New York, 1953, (437)
- EICHHOLZ A., J. Physiol., 1898, 23, 163, (52, 75, 99)
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824, (477)
- FARRELL H.M., MALLETTE M.F., BUSS E.G. et CLAGETT C.O., Biochim. Biophys. Acta,
1969, 194, 433, (459, 462, 490, 492)
- FEENEY R.E., ABPLANALP H., CLARY J.J., EDWARDS D.L. et CLARK J.R., J. Biol. Chem.,
1963, 238, 1732, (66)

- FEENEY R.E., RHODES M.B. et ANDERSON J.S., J. Biol. Chem., 1960, 235, 2633,
(37, 244)
- FEENEY R.E., STEVENS F.C. et OSUGA D.T., J. Biol. Chem., 1963, 238, 1415,
(117, 338, 366, 368, 376, 400, 542)
- FEVOLD H.L., Adv. Prot. Chem., 1951, 6, 187-252, Academic Press Inc, New York.
(12)
- FLEMING A., Proc. Roy. Soc., 1922, B93, 306, (49)
- FLETCHER A.P., MARKS G.S., MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., Biochem. J., London,
1963, 87, 265, (19)
- FORSYTHE R.H. et FOSTER J.F., J. Biol. Chem., 1950, 184, 377 et 385, (88, 111,
259, 418, 419, 421, 426, 515; 555)
- FOSSUM K. et WHITAKER J.R., Arch. Biochem. Biophys., 1968, 125, 367, (33, 68)
- FRAENKEL S. et JELLINEK C., Biochem. Z., 1927, 185, 392, (103, 223)
- FRAENKEL-CONRAT H., BEAN R.S., DUCAY E.D. et ALCOTT H.S., Arch. Biochem.
Biophys., 1952, 37, 393, (343)
- FRAENKEL-CONRAT H., BEAN R.S. et LINEWEAVER H., J. Biol. Chem., 1949, 177,
385, (344)
- FRAENKEL-CONRAT H. et PORTER R.R., Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 557,
(305, 532)
- FRAENKEL-CONRAT H., SNELL N.S., et DUCAY E.D., Arch. Biochem. Biophys., 1952,
39, 80, (34)
- FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F., J. Biol. Chem., 1949, 181, 499, (87, 109, 121,
133, 142, 146, 159, 169, 180, 183, 186, 190, 192, 196, 204, 208,
215, 222, 239, 257, 268, 292, 504, 507, 512, 514, 517, 520, 556)
506
- FROMAGEOT C., JUTISZ M., MEYER D. et PENASSE L., Biochim. Biophys. Acta,
1950, 6, 283, (537)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 207, (441)
- GARDELL S., HEIJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., Acta Chem. Scand., 1950, 4,
970, (440)
- GAUTIER A., C. R. Acad. Sci., 1874, 79, 227, (78)
- GIBBONS R.A., Biochem. J., 1963, 89, 380, (481)

- GIBBONS R.A., in "Glycoproteins, their composition, structure and function" (GOTTSCHALK A., ed.), B.B.A. LIBRARY, volume 5, p.29 Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York, 1966, (438)
- GODDWIN T.W. et MORTON R.A., Biochem. J., 1946, 40, 628, (446, 489, 493)
- GORINI L. et AUDRAIN L., Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 570, (348)
- GOT R., BOURBILLON R. et MICHON J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 41 (286)
- GOTTSCHALK A. et ADA G.L., Yale J. Biol. Med., 1956, 28, 525, (241, 272)
- GRABAR P., et Glick D., Méthods of biochemical Analysis, 1959, 7, 1, (551)
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A., Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 193 ; 1955, 17, 65, (552)
- GREEN N.M., J. Biol. Chem., 1953, 205, 535, (346, 349, 407)
- HALLIBURTON W., J. Physiol., 1892, 13, 159, (83)
- HARBON S., Thèse Doct. Sci., Paris, 1963 et HARBON S., HERMAN-BOUSSIER G. et CLAUSER H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 1279, (185, 248, 275, 276)
- HARTLEY F.K. et JEVONS F.R., Biochem. J., 1962, 82, 1P., et 1962, 84, 134, (246, 321)
- HAYCRAFT J. et DUGGAN J., Proc. Roy. Soc., 1889, 351 ; Brit. Med. J., 1890, 1, 167, (82)
- HEDIN S.G., Z. Physiol. Chem., 1907, 52, 412, (91)
- HEKTOEN L. et COLE A.G., J. Infections diseases, 1927, 40, 647 ; 1928, 42, 1, (61)
- HESSELVIK L., Z. Physiol. Chem., 1938, 254, 144, (194)
- HEWITT L.F., Biochem. J., 1938, 32, 1554, (235)
- HEWLETT R.T., J. Physiol., 1892, 13, 493, (81)
- HOFMEISTER F., Z. Physiol. Chem., 1890, 14, 165, (17)
- JEANLOZ R.W., in "Glycoproteins, Their composition, Structure and Function" (GOTTSCHALK A., ed.), B.B.A. LIBRARY, volume 5, p.362. Elsevier Publishing Company - Amsterdam, London, New-York, 1966, (439)
- JEVONS F.R., Nature, 1958, 181, 1346 ; Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 384; (131)

- JIRGENSONS B., IKENAKA T. et GORGURAKI V., *Makromol. Chem.*, 1960, 39, 149, (207, 350)
- JOHANSEN P., MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., *Nature*, 1958, 181, 1345, (20)
- JOHANSEN G. et OTTENSEN M., *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 1964, 34, 199, (401, 411)
- JOLLES P., CHARLEMAGNE D., PETIT J.F., MAIRE A.C. et JOLLES J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 2241, (377bis, 547)
- JUTISZ M., KAMINSKI M. et LEGAULT-DEMARE J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 23, 173, (123, 127, 174, 359, 362, 545, 553)
- KAMINSKI M., *J. Immunol.*, 1955, 75, 367, (64)
- KAMINSKI M. et DURIEUX J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1037, (65, 424)
- KANAMORI M. et KAWABATA M., *Agr. Biol. Chem.*, 1969, 33, 75, (138, 294, 295, 301, 302, 526, 528, 566, 567, 568)
- KAVERZNEVA E.D. et BOGDANOV V.P., *Biokhimiya*, 1962, 27, 273, (20)
- KETTERER B., *Life Sci.*, 1962, 5, 163, (28, 59, 364)
- KETTERER B., *Biochem. J.*, 1965, 96, 372, (42, 60, 365, 420, 427, 428, 429, 431, 432)
- KOTAKI A., NAOI M. et YAGI K., *J. Biochem.*, 1966, 59, 625, (494)
- KRAWKOW N., *Pflüger's Archiv.*, 1896, 63, 804, (98)
- KRUKENBERG C., *Maly Jahresbericht*, 1885, 15, 16, (97)
- KUNITZ M., *J. Gen. Physiol.*, 1947, 30, 291, (415)
- LANGSTEIN L., *Z. Physiol. Chem.*, 1900, 31, 49 ; HOFMEISTER, *Beitr.*, 1903, 3, 510, (77, 211)
- LASKOWSKI M. et LASKOWSKI M., Jr., *Advan. Protein Chem.*, 1954, 9, 203, (404,408)
- LAURELL C.B., LAURELL S. et SKOOG N., *Clin. Chem.*, 1956, 2, 99, (422)
- LEBOWITZ J. et LASKOWSKI M., Jr., *Biochemistry*, 1962, 1, 1044, (409)
- LEE Y.C. et MONTGOMERY R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95, 263; 1962 97, 9, (21, 229, 230)
- LEGER J. et MASSON G., *Ann. Allergy*, 1948, 6, 131, (355)
- LEGER J., MASSON G. et PRADO J.L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1947, 64 366, (354)

- LEVENE P.A., Z. Physiol. Chem., 1900 - 1901, 31, 395, (101)
- LEVENE P.A., et MORI T., J. Biol. Chem., 1929, 84, 49, (102, 224, 233, 312)
- LEVENE P.A. et SUAREZ L.J., J. Biol. Chem., 1918, 36, 103, (311)
- LEWIS J.C., SNEEL N.S., HIRSCHMANN D.J. et FRAENKEL-COMRAT H.; J. Biol. Chem., 1950, 186, 23, (188, 288, 296, 529)
- LINWEAVER H., MORRIS H.J., KLINE L. et BEAN R.S., Arch. Biochem., 1948, 16, 443, (69, 94)
- LINWEAVER H. et MURRAY C.W., J. Biol. Chem., 1947, 171, 565, (86, 108, 120, 132, 154, 168, 187, 203, 218, 238, 256, 267, 287, 303, 333, 335, 351, 370, 371, 516, 554)
- LONGWORTH L.G., CANNAN A.K. et Mc; INNES D.A., J. Am. Chem. Soc., 1940, 62, 2580, (62, 107, 119, 150, 158, 166, 193, 202, 255, 266)
- LOVELL D., SCHORAN C.J. et CURRAN R.C., Nature, 1966, 212, 860, (70)
- MANDELES S., J. Chromatog., 1960, 3, 256, (118)
- MARKS G.S., MARSHALL R.D., NEUBERGER A. et PAPKOFF H., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 340, (324)
- MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., Nature, 1960, 186, 311, (290, 298, 304)
- MASAMUNE H., YOSIZAWA Z. et MAKI M., Tohoku J. Exptl. Med., 1950, 53, 155 et 237, (213)
- MATSUSHIMA K., Science, 1958, 127, 1178 et Nippon Nogeï-Kagaku Kaishi., 1958, 32, 211, (29, 55, 56, 95, 342, 363, 367, 399)
- MAXFIELD M. et STEFANYE D., J. Biol. Chem., 1962, 237, 2522, (391)
- MELAMED M.D., Biochem. J., 1967, 103, 805, (153, 543, 562, 572)
- MELAMED M.D. et GREEN N.M., Biochem. J. (London), 1963, 89, 591, (51)
- MEYER K., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1938, 6, 91, (32, 36)
- MEYER K., Adv. Prot. Chem., 1945, 2, 249, (31, 85, 110, 205, 227, 237, 258, 313)
- MEYER K., PALMER J.W., THOMPSON R. et KHORAZO D., J. Biol. Chem., 1936, 113, 479, (93)
- MICHON J., Nature, 1962, 193, 1077, (114, 170)
- MICHON J., et BOURRILLON R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 277, (285)

- MILLER H.T. et FEENEY R.E., *Biochem.*, 1966, 5, 952, (30, 44, 67)
- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 857, (330, 510, 541, 569, 575, 576)
- MONTGOMERY R., LEE Y.C. et WU Y.C., *Biochemistry*, 1965, 4, 566, (18, 47, 323)
- MONTGOMERY R. et WU Y.C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, 11, 249 ;
J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547, (571)
- MONTGOMERY R., WU Y.C. et LEE Y.C., *Biochemistry*, 1965, 4, 578, (19, 47, 323)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 1639, (485)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, suppl.33 , (13)
- MONTREUIL J., *Glycoproteides in "Traité de Biochimie Générale"*, Masson Ed., 1959, 1, 935, (14)
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A. et SPIK G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 1867, (8, 317)
- MONTREUIL J., BISERTE G. et CHOSSON A., *Compt. Rend.*, 1963, 256, 3372, (327, 329, 340, 573)
- MONTREUIL J., CASTIGLIONI B., ADAM-CHOSSON A., CANER F. et QUEVAL J., *J. Biochem.*, 1965, 57, 514 ; *Biochemistry of sulfur and glycoprotéins* edited by T. Ando, F. Egami and N. Tamiya, Tokyo, p. 81 (1965).
(46, 89, 113, 130, 137, 140, ¹⁴¹149, 152, 156, 157, 160, 161, 162, 171, 172, 173, 178, 181, 182, 191, 197, 206, 232, 249, 250, 260, 261, 269, 279, 332, 360, 361, 364, 373, 430, 433, 503, 505, 509, 511, 521, 524, 540, 546 , 574)
- MONTREUIL J. et CHOSSON A., *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 255, 3071, (283)
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 13, (284)
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides, Fasc. 1 : Méthodes colorimétrique de dosages des glucides totaux. Laboratoire de Chimie biologique. Fac. Sci., éd., Lille, 1963, (382, 389)*
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides, Fasc. 2 : Méthodes chromatographiques et électrophorétiques de dosage des glucides constituant les glycoprotéines. Laboratoire de Chimie biologique. Fac. Sci., éd., Lille, 1968, (386bis)*
- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A., *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 255, 3493, (5)

- MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., SEGARD E. et SCHEPPLER N., *Chromatographie, Symposium II* p.47, Sté Belge des sciences pharmaceutiques, éd., 1962 ; *J. Pharm. Belg.*, 1968, p.47, (6, 328)
- MÖRNER C.T., *Z. Physiol. Chem.*, 1894, 18, 525 et *Z. Physiol. Chem.*, 1912, 80, 430, (64, 71, 74, 84, 105, 164, 165, 199, 200, 252, 253, 263, 264)
- NEUBERGER A., *Biochem. J.*, 1938, 32, 1435, (40)
- NEUBERGER A. et PAPKOFF H., *Biochem. J.*, 1963, 87, 581, (324bis, 570)
- NEUMEISTER R., *Z. Biol.*, 1890, 27, 309, (72, 80, 104, 163, 179, 251, 262)
- NOBLE E., LEGAULT-DEMARE J. et JUTISZ M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 1077, (306, 533, 539)
- NUENKE R.H. et CUNNINGHAM L.W., *Federation Proc.*, 1959, 18, 295, (22)
- NUENKE R.H. et CUNNINGHAM L.W., *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2452, (23)
- ODIN L., *Chemistry and Biology of mucopolysaccharides*, p.234, Churchill éd., London, 1958, (242, 273)
- OSBORNE T.B. et CAMPBELL G.F., *J. Am. Chem. Soc.*, 1900, 22, 422, (26, 76)
- OSHIRO Y. et EYLAR E.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1968, 8, 2044, (564)
- OSTROWSKI W., ZAK Z. et KRAWCZYK A., *Acta Biochim. Polon.*, 1968, 15, 241, (457, 461, 464, 466, 467, 473, 482, 483, 491)
- OSUGA D.T. et FEENEY R.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 118, 340, (335, 417)
- OSUGA D.T., FEENEY R.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1968, 124, 560, (4, 293, 300, 307, 374, 525, 527, 534)
- OSWALD A., *Z. Physiol. Chem.*, 1910, 65, 175, (212)
- PARKINSON T.L., *The chemical composition of eggs.*, *J. Sci. Fd. Agric.*, 1966, 17, 101-110, (16)
- PAVY F.W., *Proc. Roy. Soc.*, 1893, 54, 53 ; *Physiology of the carbohydrates*, London, 1894, p.53 ; *Carbohydrate metabolism*, 1907, p.44, (96)
- PENASSE L., JUTISZ M., FROMAGEOT C. et FRAENKEL-CONRAT H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 9, 551, (308, 535)
- PIEZ K.A. et MORRIS L., *Anal. Biochem.*, 1960, 1, 187, (445)
- RHODES M.B., AZARI P.R. et FEENEY R.E., *J. Biol. Chem.*, 1958, 230, 399, (54, 115, 124, 220, 293, 425, 519, 522, 557)

- RHODES M.B., BENNETT N. et FEENEY R.E., J. Biol. Chem., 1959, 234, 2054,
(449, 450, 452, 453, 455, 458, 460, 463, 465, 468, 498, 501)
- RHODES M.B.; BENNETT N. et FEENEY R.E., J. Biol. Chem., 1960, 235, 1686, (2,
(116, 155, 185, 216, 217, 243, 334, 416,))
- RHODES M.B., HILL R.M. et FEENEY R.E., Anal. Chem., 1957, 29, 376, (403, 448,
548, 558)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062 ; 1940, 34, 931, (476)
- ROBINSON D.S. et MONSEY J.B., Biochem. J., 1966, 100, 61P., (45, 53)
- ROMANOFF A.L. et ROMANOFF A.J., The Avian egg, John Wiley and sons ed.,
New-York, 1949, (10)
- ROSEMAN S. et DAFFNER I., Anal. Chem., 1956, 28, 1743, (214)
- ROSEMAN S. et LUDOWIEG J., J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 300 (387bis, 442,
486)
- SAMUELY F., Biochem. Handb., 1911, 4, 147, (1)
- SANGER F., Biochem. J., 1945, 39, 507, (396, 531)
- SCHEIDEGGER J., J. Intern. Arch. Appl. Immunol., 1955, 7, 103, (550)
- SCHLACK P. et KUMPF W., Z. Physiol. Chem., 1926, 154, 125, (538)
- SCHUTZENBERGER P., Maly Jahresbericht über Thierchenie, p.299 ; cité par
EICHHOLZ, J. Physiol., 1898, 23, 163, (100)
- SNELL F.D. et SNELL C.T., colorimetric methods of analysis, VolIII, 3rd edition,
D. Van Nostrand Company, New York, 1949, p.657, (497)
- SNELL E.E. et STRONG F.M., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1939, 11, 346, (499)
- SØRENSEN M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 1934, 20, n°3, (41, 225, 234,
270)
- SPIES J.R. et CHAMBERS D.C., Analyt. Chem., 1948, 20, 30, (447, 488)
- SPIK G., Dipl. Et. Sup., Lille, 1963 et Thèse Doct., Lille, 1968, (381, 388)
- SPIK G., Thèse Doct., Lille, 1968, (487)
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 739, (383, 390)
- SQUIRE P.G., DELIN S. et PORATH J., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 409,
(435)
- SRI-RAM J., TERMINIELLO L., BIER M. et NORD F.F., Arch. Biochem. Biophys.,
1954, 52, 451, (347, 544)

- SRI-RAM J., TERMINIELLO L., BIER M. et NORD F.F., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 52, 464, (345)
- STACEY M. et WOLLEY J.M., J. Chem. Soc., 1940, 184 et 1942, 550, (226, 236, 271, 314)
- STEVENS F.C., FEENEY R.E., Biochemistry, 1963, 2, 1346, (3, 289, 297, 352, 530)
- STOFFYIN P.J. et JEANLOZ R.W., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 52, 373, (443)
- SVENNERHOLM L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1956, 61, 75 ; SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154, (444)
- TANAKA M., J. Pharm. Soc. (Japan), 1961, 81, 1460, 1464, 1467, 1470, (320)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36, (475)
- TISELIUS A., HJERTEN S. et LEVIN O., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 132, (423)
- TOMIMATSU Y., CLARY J.J., et BARTULOVICH J.J., Arch. Biochem. Biophys., 1966, 115, 536-544, (43, 57, 369, 372, 375, 377, 379, 393, 412)
- TRISTRAM G.R. et SMITH R.H., Advances in Protein Chemistry (Academic Press), 1963, 13, 227, (406)
- TURNER R.A. et SCHMERZLER G., Biochim. Biophys. Acta, 1953, 11, 586, (309, 536)
- WARNER R.C., "The Proteins", Neurath et Bailey ed., vol. II, part I, Academic Press Inc., Pub., New York, 1954, p.440; (11)
- WARREN L., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1971, (392)
- WEBER M., ZAK Z. et OSTROWSKI W., Folia Biologica (Kraków), 1966, 14, 357, (456)
- WEIL L. et TIMASHEFF S.N., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 87, 135, (337)
- WERNER I. et ODIN L., Upsala Läkare foreninger Föhranlänger, 1949, 54, 49 ; Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230, (106, 167, 201, 254, 265, 385, 479)
- WEYDEMAN, Dissert., Marburg, 1896, (209)
- WILLIAMS J., Biochem. J., 1962, 83, 355, (38, 48)
- WINDLE J.J., WIERSEMA A.K., CLARK J.R. et FEENEY R.E., Biochemistry, 1963, 2, 1341, (27)
- WU F.C. et LASKOWSKI M., J. Biol. Chem., 1955, 213, 609, (336)
- YAGI K., NAOI M. et KOTAKI A., J. Biochem, 1966, 59, 91, (495)

- YAMASHINA I. et IZUMI K., in Biochemistry and Medicine of mucopolysaccharides,
Egami F. et Oshima Y. ed., Redearch on mucopolysaccharides, Tokyo,
1962, p.38, (24)
- YAMASHINA I. et MAKINO M., J. Biochem.,(Japon), 1962, 51, 359, (25)
- YAMAUCHI T. et YAMASHINA I., J. Biochem., 1969, 66, 213, (563)
- YOUNG E.G., J. Biol. Chem., 1937, 120, 1 (35)
- YOUNG E., Nature, 1940, 145, 1021, (177)
- ZAK Z. et OSTROWSKI W., Acta Biochim. Polon., 1963, 10, 427, (502)
- ZAK Z., WEBER M. et OSTROWSKI W., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 795,
(469, 470, 474)
- ZANETTI C., Ann. Chim. Pharm., 1897, 12, (210)

