

50376
N° d'ordre : 136

1973
187

50376
1973
187

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

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

Par

Jean-Yves LEVEAU

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

RECHERCHES SUR LES PROTEIDES DU JAUNE D'ŒUF DE POULE

ISOLEMENT DE DEUX GLYCOPROTEINES



PRÉSENTÉ LE 30 MARS 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. J. MONTREUIL Président
M^{me} G. SPIK Rapporteur
M. A. BONASTRE Examineur
M. E. JAKUBCZAK Examineur



030 025792 3

Ce travail a été effectué dans les laboratoires de l'ÉCOLE
NATIONALE SUPÉRIEURE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES,
(Centre de DOUAI).

A mon Père,

En hommage à l'exemple de courage
et de persévérance qu'il m'a donné.

A ma Mère,

Bien faible témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

**Professeur de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et
Techniques de Lille,**

Je vous remercie vivement de l'intérêt que vous avez porté à ce travail, cela en dépit d'une tâche écrasante, et je suis très honoré que vous présidiez le jury de cette thèse.

A Mademoiselle G. SPIK

**Maître de conférence de Chimie Biologique à l'Université des Sciences
et Techniques de Lille,**

Etudiant à la Faculté des Sciences de Lille, j'ai pu apprécier votre simplicité et votre amabilité. Vous avez accepté la lourde responsabilité de rapporteur de cette thèse, je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance.

A Monsieur A. BONASTRE

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

Il y a dix ans, vous veniez de m'accueillir comme Elève-Ingénieur à l'E.N.S.I.A. Vous avez été, ensuite à l'origine de la situation que j'occupe actuellement et vous avez mis à ma disposition les moyens de réaliser ce travail. Vous avez enfin accepté de juger cette thèse. Je ne saurais oublier tout ce que je vous dois et souhaite que vous trouviez ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

A Monsieur J. CLAVEAU

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

Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour les conseils et les encouragements que vous m'avez prodigués, l'amitié et la confiance que vous avez bien voulu m'accorder me sont précieuses et je voudrais toujours les mériter.

A Monsieur E. JAKUBCZAK

Maître Assistant à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles
et Alimentaires,

Etudiant à l'E.N.S.I.A., vous m'avez initié aux techniques de
la Microbiologie. Avec la même rigueur, vous m'avez ensuite appris à
goûter les joies du métier de chercheur. Je vous remercie et souhaite
que vous puissiez trouver au fil des pages de ce mémoire, la marque
de votre exemple.

J'adresse mes plus vifs remerciements :

à Madame S. MOUY pour son dévouement et sa constante bonne humeur,

à Monsieur B. FOURNET qui a bien voulu se charger de la détermination des compositions en sucres,

à Monsieur P. SECRETIN, dont l'aide m'a été précieuse lors de la détermination des compositions en acides aminés,

à Mesdames Y. KACZMAREK, M. MANET, A. PECQUEUR et F. RULENCE, qui ont dactylographié ce mémoire,

à Madame A. DHAINAUT qui a contribué à des titres divers à la réalisation de ce travail.

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et
Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, M^{me} BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, M^{me} LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT de l'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. DEFRETIN René
Professeur de Biologie Marine,
Directeur de l'Institut de
Biologie Maritime et Régionale de
Winereux

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPIER Marcel	Mathématiques Générales
M. DEFRETIN René	Biologie Marine
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. JOLY Robert	Biologie (Amiens)
M ^{me} LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie

PROFESSEURS TITULAIRES (Suite)

M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique
Me SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. FLATRES Pierre	Géographie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. PRUDHOMME Rémy	Droit et Sciences Economiques
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Me MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. EKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Mathématiques
M. BRIDOUX Michel	Chimie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M. FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Réni	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques et Sociales
M. HERMAN Maurice	Physique
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques
Me LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
Me MAILLET Monique	Sciences Economiques
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MERIAUX Enile	Sciences de la Terre
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PERTUZON Enile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valencienncs)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
Me RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SALMER Georges	Radio Electricité Electronique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) (suite)

M. SEGUIER Guy	Electronique
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIVA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique
M. WATERLOT Michel	Géologie
Mc ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	2
<u>1. LA FRACTION LIPIDIQUE</u>	3
<u>I - LES LIPIDES</u>	4
<u>A - REPARTITION</u>	4
<u>B - COMPOSITION EN ACIDES GRAS</u>	6
<u>C - LES DIFFERENTS CONSTITUANTS</u>	6
1° - LES GLYCERIDES	6
2° - LES PHOSPHATIDES	9
3° - LES STERIDES	9
<u>D - VARIATIONS DE LA COMPOSITION EN LIPIDES</u>	12
1° - EN FONCTION DE LA NATURE DU REGIME ALIMENTAIRE	12
2° - EN FONCTION DE LA RACE	12
3° - AU COURS DE L'INCUBATION	13
<u>II - LES LIPOPROTEINES</u>	13
<u>A - PREPARATION</u>	13

<u>B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE</u>	15
<u>C - LES COMPLEXES : LIPOVITELLINES ET LIPOVITELLENINE</u>	19
1° - <u>LES LIPOVITELLINES</u>	19
a) La Partie Lipidique	21
b) La Partie Protidique	24
2° - <u>LA LIPOVITELLENINE</u>	26
a) La Partie Lipidique	29
b) La Partie Protidique	32
<u>D - LIPOPROTEINES DU JAUNE D'OEUF ET DU SERUM DE POULE</u>	34

2. LA FRACTION HYDROSOLUBLE

35

<u>I - LES LIVETINES</u>	36
<u>A - PREPARATION</u>	36
1° - LES METHODES GENERALES DE PREPARATION	36
2° - LES METHODES PARTICULIERES DE PREPARATION	36
<u>B - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES</u>	37
1° - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	37
a) Comportement Electrophorétique	37
1. L'électrophorèse libre	37
2. L'électrophorèse de zone	38

b) Analyse Immuno-Electrophorétique	39
2° - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	43
3° - <u>ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE</u>	43
<u>C - LES CONSTITUANTS α , β ET γ LIVETINES</u>	45
1° - PREPARATION	45
2° - COMPOSITION CHIMIQUE ET CARACTERISTIQUE	47
<u>D - LIVETINES ET PROTEINES SERIQUES DE LA POULE</u>	50
<u>II - LA PHOSVITINE</u>	54
<u>A - PREPARATION</u>	54
1° - <u>LES METHODES GENERALES DE PREPARATION</u>	54
2° - <u>LES METHODES PARTICULIERES DE PREPARATION</u>	54
a) Les Méthodes par Précipitation	54
b) Les Méthodes Chromatographiques	56
<u>B - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES</u>	56
1° - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	56
a) Masse Moléculaire	56
b) Comportement Electrophorétique	57
1. L'électrophorèse libre	57
2. L'électrophorèse de zone	57
c) Comportement Chromatographique	59

2° - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	59
a) Composition	59
b) Composition de la Fraction Protéique	60
c) Composition de la Fraction Glycannique	60
d) Structure	62
<u>C - ROLE</u>	62
<u>D - PHOSVITINE ET PROTEINES SERIQUES DE LA POULE</u>	63
<u>III - LA RIBOFLAVOPROTEINE</u>	64
<u>A - PREPARATION</u>	64
1° - PREPARATION DE LA RIBOFLAVOPROTEINE	64
2° - PREPARATION DE L'AOPROTEINE	65
<u>B - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES</u>	65
1° - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	65
a) Masse Moléculaire	65
b) Comportement électrophorétique	66
1. Electrophorèse libre	66
2. Electrophorèse de zone	66
b) Propriétés Optiques	68
2° - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	68
a) Analyse Elémentaire	68
b) Composition de la Fraction Glycannique	70

c) Composition de la Fraction Protidique	72
1. Composition en acides aminés	72
2. Acides aminés N et C Ternaux	72
3. Structure	72
d) Le Groupement Prosthétique	72
1. Détermination qualitative	72
2. Détermination quantitative	74
3. Fixation du groupement prosthétique sur la protéine	74
<u>C - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES</u>	76
<u>D - RIBOFLAVOPROTEINES DU SERUM DE LA POULE, DU BLANC ET DU JAUNE D'OEUF.</u>	76
<u>E - ROLE</u>	77
<u>IV - LA TRANSFERRINE</u>	77
<u>A - PREPARATION</u>	77
<u>B - PROPRIETES</u>	78
1° - <u>COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE</u>	78
2° - <u>ANALYSE IMMUNOLOGIQUE</u>	78
3° - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	79
a) Composition en Glucides	79
b) Composition de la Fraction Protidique	81
<u>V - LE VITELLOMUCOIDE</u>	83
<u>A - PREPARATION</u>	83
1° - <u>PROCEDES DE ONOE</u>	83
a) Premier Procédé	83
b) Second Procédé	83

2° - <u>METHODE DE WILLIAMS</u>	84
3° - <u>PREPARATION DU VITELLOMUCOIDE SELON SEZILLE</u>	84
<u>B - PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES</u>	84
1° - <u>PROPRIETES PHYSIQUES</u>	84
a) Solubilité	85
b) Pouvoir Rotatoire	85
c) Point Isoélectrique	85
d) Comportement Electrophorétique	85
2° - <u>PROPRIETES CHIMIQUES</u>	86
a) Analyse Elémentaire	86
b) Composition en Glucides	86
<u>VI - CONSTITUANTS SOLUBLES DIVERS</u>	87
<u>A - COMPLEXE PROTEIQUE DE LA VITAMINE B₁₂</u>	87
<u>B - ENZYMES</u>	88
<u>C - PROTEIDES DU BLANC D'OEUF</u>	88
<u>D - COMPOSANTS DIALYSABLES</u>	89
1° - LE GLUCOSE	89
2° - LES ACIDES AMINES	89
3° - LES COMPOSANTS MINERAUX : MACRO ET OLIGO ELEMENTS	90
<u>CONCLUSION</u>	90

TRAVAUX PERSONNELS

93

INTRODUCTION

94

1. ETUDE DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES DU JAUNE D'OEUF

95

I - PREPARATION DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES DU JAUNE D'OEUF

96

A - MODES OPERATOIRES

96

1° - METHODES DE PREPARATION DES LIVETINES

96

a) Méthodes de SHEPARD et HOTTLE

96

b) Méthode de KNIGHT et SCHECHTMAN

99

c) Méthode de MARTIN et Coll

99

2° - AUTRES METHODES DE PREPARATION

99

a) Méthode de ZAK et Coll

99

b) Méthode de ONOE

103

B - RESULTATS - CONCLUSIONS

103

C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LES METHODES DE PREPARATION DES
PROTEINES SOLUBLES TOTALES

105

II - ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES
SOLUBLES TOTALES.

105

A - ETUDE ELECTROPHORETIQUE

107

1° - MODES OPERATOIRES

107

- a) Electrophorèse sur Papier, en Gel d'Agar et sur Acétate de Cellulose 107
- b) Electrophorèse en Gel Mixte d'Acrylamide - Agarose 108
 - 1. Réhydratation 108
 - 2. Migration électrophorétique 108
 - 3. Coloration 109

2° - RESULTATS

109

- a) Electrophorèse sur Papier 109
- b) Electrophorèse en Gelose 111
- c) Electrophorèse sur Acétate de Cellulose 111
- d) Electrophorèse en Gel d'Acrylamide - Agarose 111

3° - CONCLUSION DE L'ETUDE ELECTROPHORETIQUE

115

B - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

119

1° - MODE OPERATOIRE

119

- a) Préparation de l'Immun-sérum 119
- b) L'Immunoélectrophorèse 119

2° - RESULTATS

120

3° - CONCLUSION

120

C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT L'ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET

122

IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES.

2. ETUDE DES CONSTITUANTS A COMPORTEMENT PREALBUMINIQUE	123
<u>I - PREPARATION ET ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA RIBOFLAVOPROTEINE</u>	124
<u>A - PREPARATION</u>	124
1° - <u>PROCEDE DE ZAK ET OSTROWSKI</u>	124
a) Extraction des Protéines Solubles	124
b) Fractionnement des PST - 4	124
1. Préparation d'une fraction enrichie en RFP	124
2. Purification de la fraction enrichie en RFP	125
2° - <u>ADAPTATION DU PROCEDE DE RHODES, BENNET et FEENEY</u>	125
a) Préparation des Protéines Solubles Totales	125
b) Préparation de la Riboflavoprotéine	125
1. Obtention de la riboflavoprotéine brute	125
2. Purification de la riboflavoprotéine brute	127
3° - <u>CONCLUSIONS</u>	129
<u>B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE</u>	129
1° - ELECTROPHORESE EN GELOSE	129
2° - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE	129
3° - ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE - AGAROSE	131
4° - CONCLUSIONS	131
<u>II - PREPARATION ET ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA PHOSVITINE</u>	131
<u>A - PREPARATION</u>	131

1° - PROCÉDE DE MECHAM ET OLCOTT	131
2° - MODIFICATION DU PROCÉDE DE MECHAM ET OLCOTT	131
3° - RESULTATS - CONCLUSIONS	133
<u>B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA PHOSVITINE</u>	133
1° - <u>PRINCIPES</u>	133
2° - <u>MODES OPERATOIRES</u>	135
a) Choix des Techniques	135
b) Electrophorèse en Gel d'Agarose	136
c) Electrophorèse en Gel d'Acrylamide - Agarose	136
3° - <u>RESULTATS</u>	137
a) Préparation de la Phosvitine	137
b) Etude Particulière de la Phosvitine	139
1. en Gel d'Agarose	139
2. en Gel d'Acrylamide - Agarose	139
4° - <u>CONCLUSIONS</u>	139
<u>III - ISOLEMENT DU COMPOSE PA₁</u>	142
<u>A - PREPARATION ET ETUDE D'UNE FRACTION A₁</u>	142
1° - PRINCIPE	142
2° - MODE OPERATOIRE	142
3° - RESULTATS	143
4° - CONCLUSIONS	146
<u>B - ESSAI DE PURIFICATION DE LA FRACTION A₁</u>	149

1° - MODE OPERATOIRE	149
2° - RESULTATS	149
3° - CONCLUSIONS	152
<u>C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LE COMPOSE PA₁</u>	152
<u>IV - PROPRIETES COMPAREES DES CONSTITUANTS A COMPORTEMENT PREALBUMINIQUE</u>	152
<u>A - PROPRIETES PHYSIQUES</u>	152
1° - <u>COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE</u>	152
a) Mode Opérateur	152
b) Résultats	152
c) Conclusion	152
2° - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	154
a) Absorption de la Lumière	154
b) Pouvoir Rotatoire Spécifique	154
3° - <u>POINTS ISOELECTRIQUES</u>	154
a) Mode Opérateur	154
b) Résultats - Conclusions	156
<u>B - PROPRIETES CHIMIQUES</u>	156
1° - <u>COMPOSITION EN PHOSPHORE</u>	156
a) Méthode	156
b) Résultats - Discussion	158
2° - <u>COMPOSITION DE LA FRACTION GLYCANNIQUE</u>	158
a) Composition Centésimale en Glucides	158

1. Méthodes	158
2. Résultats	158
b) Composition en Osés Neutres	158
1. Méthodes	158
2. Résultats	161
c) Conclusions	161
1. Riboflavoprotéine	161
2. Phosvitine	161
3° - <u>COMPOSITION DE LA FRACTION PROTIDIQUE</u>	161
a) Méthodes	161
b) Résultats - Discussion	162
<u>C - CONCLUSION CONCERNANT LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	162
<u>DES COMPOSES A COMPORTEMENT PREALBUMINIQUE.</u>	
<u>V - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LES COMPOSES A COMPORTEMENT</u>	164
<u>PREALBUMINIQUE.</u>	
3. ISOLEMENT ET ETUDE DU VITELLOMUCOIDE	165
<u>I - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES PST - 3</u>	166
<u>A - PRINCIPE</u>	167
<u>B - MODE OPERATOIRE</u>	167

<u>C - RESULTATS</u>	169
<u>D - CONCLUSIONS</u>	173
<u>II - ISOLEMENT DU CONSTITUANT C</u>	173
<u>A - FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM DES PST - 3</u>	174
1° - PRINCIPE	174
2° - MODE OPERATOIRE	174
3° - RESULTATS	174
4° - CONCLUSIONS	177
<u>B - PURIFICATION DE LA FRACTION S₄</u>	180
1° - <u>PRINCIPE</u>	180
2° - <u>MODES OPERATOIRES</u>	180
a) Chromatographie du S ₄ sur DEAE - Cellulose	180
b) Sous Fractionnement du Pic A	181
3° - <u>RESULTATS</u>	181
a) Chromatographie du S ₄ sur DEAE - Cellulose	181
b) Sous Fractionnement du Pic A	183
4° - <u>CONCLUSIONS</u>	188
<u>C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT L'ISOLEMENT DU CONSTITUANT C</u>	191

<u>III - ETUDE DU COMPOSE C</u>	191
<u>A - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES</u>	191
1° - <u>IDENTIFICATION DE L'ARC DE PRECIPITATION</u>	192
a) Mode Opérateur - Principe	192
b) Résultats - Conclusion	192
2° - <u>REACTION DU COMPOSE C CONTRE L'IMMUNSERUM ANTI-A₁</u>	192
<u>B - PROPRIETES PHYSIQUES</u>	195
1° - <u>PROPRIETES OPTIQUES</u>	195
a) Absorption de la Lumière	195
b) Pouvoir Rotatoire Spécifique	195
2° - <u>POINT ISOELECTRIQUE</u>	195
3° - <u>CONCLUSIONS</u>	195
<u>C - PROPRIETES CHIMIQUES</u>	197
1° - <u>TENEUR EN PHOSPHORE</u>	197
a) Méthode	197
b) Résultats	197
2° - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES</u>	198
a) Méthodes	198
b) Résultats	198
3° - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u>	198

a) Méthodes	198
b) Résultats	198
4° - <u>CONCLUSION</u>	198
<u>IV - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LE COMPOSE C</u>	201
CONCLUSION GENERALE	202
BIBLIOGRAPHIE	205

Voyez-vous cet oeuf ?.

C'est avec cela qu'on renverse
toutes les écoles de Théologie
et tous les temples de la terre.

DIDEROT

Entretien avec d'Alembert.

Dans le cadre des activités du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, et à la suite du travail réalisé par JAKUBCZAK (1971) (1), sur les glycoprotéines du blanc d'oeuf de poule il paraissait logique de s'intéresser au jaune et en particulier aux glycoprotéines qu'il contient.

Dans ce présent mémoire, nous allons faire le point des connaissances acquises, à ce jour, sur les constituants du jaune d'oeuf : Lipides et Lipoprotéines tout d'abord. Composés Hydrosolubles ensuite. Puis nous décrirons les résultats que nous avons obtenus au cours de nos recherches orientées vers l'étude de la fraction hydrosoluble. Dans une première partie, nous envisagerons les méthodes de préparation ainsi que l'étude électrophorétique et immunoélectrophorétique des protéines solubles du jaune d'oeuf. Cette première étape nous conduira à la mise en évidence de constituants nouveaux que nous chercherons à identifier dans la deuxième partie. Enfin, la troisième partie sera consacrée à l'isolement et à l'étude d'une glycoprotéine du jaune d'oeuf : le vitellomucoïde.

Le jaune et le blanc de l'oeuf sont très différents l'un de l'autre.

Le blanc d'oeuf est très hydraté et ne renferme guère que des protides et des macro-minéraux.

Le jaune, par contre, est peu hydraté et concentre tous les constituants biologiquement indispensables : protides, lipides, macro-éléments et oligo-éléments.

Le jaune occupe le centre de l'oeuf. Il est entouré par la membrane vitelline, qui, en séparant le jaune du blanc, assure l'intégrité de l'oeuf.

La structure de la membrane vitelline a été étudiée par FEVOLD (1951) (2). BELLAIRS et Coll (1963) (3) ont montré que la membrane vitelline, dont le poids total est d'environ 7 mg/oeuf, comprend 2 parties :

- Une partie interne formée de fibres analogues à celles du tissu connectif et secrétée par l'épithélium folliculaire au niveau de l'ovocyte.

- Une partie externe deux fois plus épaisse, constituée par des protéines de même constitution que celle de l'albumen, secrétée vraisemblablement par l'unfimbrium de l'oviducte (BAIN et Coll - 1969) (4).

Le jaune d'oeuf est constitué de couches concentriques les unes plus foncées que les autres (ROMANOFF et ROMANOFF - 1949) (5). Cette organisation régulière est visible sur la coupe d'un jaune d'oeuf cuit dur. Cette différence de couleur correspond à des différences de composition chimique. Les couches pâles représentent 5 % du jaune. Leur rapport lipides/protides est plus faible que celui des couches plus sombres (RIDDLE - 1911) (6) , (SPOHN et Coll - 1916) (7).

Les Constituants du Jaune d'Oeuf

1 - Analyse Globale (OLIVE - 1968) (8)

Eau	:	49 %
Protides	:	16,5 %
Lipides	:	33 %
Glucides	:	1 %
Minéraux	:	0,6 %.

2 - Composition

Il est possible, selon JACQUOT et ADRIAN (1954) (9) de distinguer un élément constant : protides, lipides, glucides, macro-minéraux, et un élément variable, représenté par les oligo-constituants : Vitamines, Acides Aminés libres et minéraux.

1 - LA FRACTION LIPIDIQUE

C'est la fraction la plus importante du jaune d'oeuf : elle fait l'objet de nombreux travaux.

I - LES LIPIDES

Ils représentent en moyenne, 33 à 35 % du poids du jaune d'oeuf frais.

A - REPARTITION

Les différents lipides du jaune d'oeuf ont été étudiés en particulier par KAUCHER (1944) (10) et LEA (1962) (11).

Selon SEZILLE (1964) (12), les lipides du jaune d'oeuf se répartissent en 2 groupes :

- Les lipides neutres : d'une part, pour 73 % des lipides totaux, eux-mêmes répartis en :

. Glycérides	: 93 %
. Cholestérol et Stéroïls	: 6 %
. Stérides	: 1 %

- Les phosphatides : d'autre part, pour 27 % des lipides totaux, répartis en :

. Céphalines et Lysocéphalines	: 17 %
. Lécithines	: 73 %
. Lysolécithines	: 6 %
. Sphingomyélines	: 2,5 %
. Inositides	: 0,5 %
. Plasmalogènes	: 0,2 %

En outre, cet auteur a précisé la présence d'acide gras libres dans le jaune d'oeuf.

La composition moyenne en lipides du jaune selon SEZILLE (1964) (13) est résumée dans le tableau I (P. 5).

Il convient de rattacher aux lipides, les pigments liposolubles, caroténoïdes, représentant 0,2 % du jaune (JACQUOT et ADRIAN - 1954) (14) ainsi que les vitamines A, D, E et K présentes dans le jaune d'oeuf.

Tableau I
Composition Lipidique du Jaune d'Oeuf
Selon SEZILLE (1964) (13)

Nature des Lipides	% des Lipides Totaux	% du jaune	En mg par Jaune Frais
<u>Lipides Totaux</u>	100	35	5.600
- Glycérides	62	22	3.500
- Stérides	0,34	0,12	11
- Cholestérol libre	4,1	1,45	232
- Acide gras libre	0,4	0,14	22,5
<u>Phosphatides</u>	30,5	10,7	1.715
- Céphalines	6,7	2,34	375
- Lécithines	20,7	7,25	1.160
- Lysolécithines	1,9	0,66	106
- Sphingomyélines	1,2	0,41	65,5
- Inositides)	Traces	Traces	Traces
- Plasmalogènes {			



B - COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Les lipides totaux sont surtout analysés du point de vue de leur composition en acides gras.

Les principaux travaux sur cette question ont été réalisés par : TERROINE et BELIN (1927) (15) , FISCHER et LEVEILLE (1957) (16) , JAMES et WEBB (1958) (17) , EVANS et BANDEMER (1961) (18) , COPPOCK (1962) (19).

SEZILLE (1964) (20) , SEZILLE et BISERTE (1964) (21) , par chromatographie sur couche mince et chromatographie gaz-liquide, ont déterminé cette composition avec précision, levant ainsi l'incertitude des résultats discordants obtenus par les autres auteurs. Cette composition est précisée dans le Tableau II (p. 7).

Il faut noter la prédominance très nette de l'acide oléique (44 % des acides gras des lipides totaux) : l'acide gras saturé le plus important étant l'acide palmitique (27 % des acides gras des lipides totaux).

Pour ce qui est des acides gras libres, leur pourcentage en acide arachidonique (4 %), acides gras indispensable, est loin d'être négligeable.

C - LES DIFFERENTS CONSTITUANTS

1° - LES GLYCERIDES

Ils font l'objet de travaux relativement peu nombreux, parmi lesquels il convient de citer, tout d'abord, ceux de SHORLAND (1951) (22) REISER (1951) (23) EVANS ET BANDEMER (1961) (24). Après avoir isolé les glycérides, ces auteurs, ont étudié la composition en acides gras.

PRIVETT et Coll (1962) (25) , ont séparé les différentes fractions lipidiques du jaune d'oeuf par chromatographie sur couche mince et, après avoir étudié la composition en acides gras de chacune d'entre elles, ont étudié la structure des glycérides. Les résultats qu'ils ont obtenus sont rassemblés dans le Tableau III (p. 8).

La composition en acides gras , selon SEZILLE (1964) (26) est donnée au Tableau II (p. 7). Elle est très voisine de celle des lipides totaux avec un fort pourcentage en acide oléique (48 %).

Tableau II

Composition en Acides Gras des Différents Lipides du Jaune d'Oeuf

Selon SEZILLE (1964) (20)

Acides Gras %	Saturés				Insaturés				
	Myristique 14 : 0	Palmitique 16 : 0	Stéarique 18 : 0	Palmitoléique 16 : 1	Oléique 18 : 1	Linoléique 18 : 2	Linoléique 18 : 3	Arachidonique 20 : 4	
Lipides Totaux	0,7	<u>27,2</u>	7,3	4,3	<u>44</u>	14	1	0,5	
Lipides Neutres	0,9	<u>31</u>	4,5	5	<u>42,2</u>	12	0,5	0,5	
Triglycérides	0,5	27,5	5,5	0	<u>48</u>	11,5	0,5	Traces	
Stérides	4	32,5	10,5	6,5	35	11,5	traces	Traces	
Acides Gras Libres	1,5	25	8,5	4,5	46,5	8,5	1,5	4	
Phosphatides	0,7	32	12,5	2,8	34,5	14,5	0,4	3,8	
Céphalines	3	22,5	<u>22</u>	5,5	<u>24</u>	11		non dosés	
Lécithines	1,8	36,5	14	4,3	30	13,5		non dosés	



Tableau III
Répartition des Triglycérides du Jaune d'Oeuf
PRIVETT et Coll (1962) (25)

Triglycérides Trisaturés.....	GS ₃	2 %
" Di saturés-monoinsaturés.....	GS ₂ E	28 %
" Monosaturés-di insaturés.....	GSE ₂	31 %
" Tri insaturés.....	GE ₃	39 %



Concernant cette composition en acides gras, les chiffres proposés par les auteurs présentent entre eux, des différences parfois sensibles. A titre d'exemple, TATTRIE et COOK (1968) (27) ont proposé les chiffres figurant au Tableau IV (p. 10).

Mais ces auteurs ont déterminé également la structure détaillée des tri-glycérides. Ils ont évalué à 60 le nombre des différents glycérides présents et donnent, pour 16 d'entre eux qui, quantitativement, sont les plus importants, les proportions figurant au Tableau V (p. 11).

Enfin, ils ont proposé une répartition au "hasard" des acides gras dans les glycérides.

2° - LES PHOSPHATIDES

De nombreux travaux ont été consacrés à leur étude :

- LEA et Coll (1955) (28) ont mis en évidence la présence des lysocomposés et des plasmalogènes.

- RHODES et Coll (1956) (29) (1957) (30) ont proposé une méthode de fractionnement par chromatographie.

- INOUE et NODA (1958) (31) TATTRIE (1959) (32), EVANS (1961) (33) ont étudié la composition en acides gras des constituants isolés.

Les travaux de SEZILLE (1964) (34) ont permis de lever l'incertitude résultant de la discordance des résultats obtenus par les différents auteurs.

La composition en acides gras, ainsi que la structure des Lécithines du jaune d'oeuf, ont été rapportées par PRIVETT et Coll (1962) (35), TATTRIE et COOK (1968) (36).

Les résultats donnés par les auteurs sur la composition en acides gras diffèrent sensiblement de ceux proposés par SEZILLE (1964) (37).

La caractéristique essentielle des phosphatides réside dans leur richesse en acides gras saturés. Les céphalines, par ailleurs, sont plus riches en acide stéarique que les autres constituants lipidiques du jaune.

3° - LES STERIDES

KAUCHER et Coll (38) dès 1944 ont signalé la présence de stérides ainsi que celle de cholestérol libre dans le jaune d'oeuf.

Tableau IV

Composition en Acides Gras des Glycérides du Jaune d'Oeuf

TATTRIE et COOK (1968) (27)

Acides Gras	Acides Gras en p. 100
Palmitique (P)	21,5
Palmitoléique (Po)	3,9
Stéarique (S)	7,5
Oléique (O)	57,1
Linoléique (L)	10,0



Tableau V
Composition des Glycérides du Jaune
TATRIE et COOK (1968) (27)

Type de Glycérides *	% des Glycérides
OOL	4,1
LLO	1,1
OLO	5,0
OLP	5,6
OLS	1,6
OOPo	3,4
OOO	18,2
LOP	2,3
POPo	1,9
POO	20,3
SOO	6,0
PLP	1,6
OPP	2,0
PSO	1,6
POS	3,3
POP	5,7
Glycérides Mineurs	16,3

* Pour la signification des abréviations voir le Tableau IV (p. 10).



L'étude de ces constituants également, a été reprise par SEZILLE (1964) (39) qui a proposé une méthode de dosage des stérides après isolement par chromatographie sur couche mince de gel de silice, et a dosé les acides gras présents, constitués essentiellement par l'acide palmitique (32 %) et l'acide oléique (35 %).

D - VARIATION DE LA COMPOSITION EN LIPIDES

La teneur en lipides du jaune d'oeuf est relativement constante. Par contre, qualitativement, les lipides sont variables :

1° - EN FONCTION DE LA NATURE DU REGIME ALIMENTAIRE

L'influence du régime alimentaire sur la composition en acides gras des lipides du jaune d'oeuf fait l'objet de nombreux travaux.

C'est ainsi que GAGE et FISH (1924) (40) , RHODES et LEA (1956) (41) FISHER et LEVEILLE (1957) (42) , CALET (1959) (43) , FEIGENBAUM (1959) (44) BASU ROY CHOUDURY (1959) (45) SKELLON et WINDSOR (1962) (46) , LECLEROQ (1969) (47) ont établi l'incidence des lipides ingérés par la poule sur la composition en acides gras des fractions lipidiques du jaune.

L'influence de l'acide linoléique en particulier, a été étudiée. Cet acide gras, indispensable, ne peut pas être synthétisé par la poule. Il est obligatoirement d'origine alimentaire. Ainsi BASU ROY CHOUDURY (48) a montré que l'addition de 7,5 % d'acide linoléique dans la ration fait passer rapidement les taux initiaux de cet acide, qui sont de 12 % et de 16 % respectivement dans les glycérides et les phosphatides, à 30 %.

Dans les rations habituelles, le maïs assure largement l'apport alimentaire nécessaire, ce qui n'est pas toujours le cas lorsque le maïs est remplacé par d'autres céréales (BLUM - 1970) (49).

COPPOCK et Coll (1962) (50) signalent l'influence des saisons sur les régimes et sur la composition lipidique du jaune.

2° - EN FONCTION DE LA RACE

Selon HARRIS et WILCOK (1963) (51) les différences de composition des lipides, observées entre souches sont d'importance mineure.

Pour EDWARDS (1964) (52), on peut enregistrer des différences de composition significatives, en ce qui concerne les acides palmitoléique, stéarique, linoléique et arachidonique, en fonction de la race.

3° - AU COURS DE L'INCUBATION

Différents travaux ont eu pour objet l'étude de la variation de la composition lipidique du jaune d'oeuf mis en incubation : KAZAKOV (1956) (53) a suivi l'évolution de la concentration en phosphore du jaune d'oeuf. NEBUSKY (1958) (54) a étudié l'évolution des lécithines au cours de l'incubation.

Enfin, TSUJI, BRIN et WILLIAMS (1955) (55) d'une part, SEZILLE (1964) (56) d'autre part, ont suivi l'évolution, parallèlement, des lipides embryonnaires et des lipides du jaune résiduel.

Cette dernière étude montre que les lipides du jaune sont utilisés par l'embryon à deux fins :

. Dans une première phase (jusqu'au 12e jour), ils sont utilisés comme source d'énergie chimique.

. Dans une deuxième phase (après le 12e jour), l'embryon ayant acquis un pouvoir de synthèse élevé, les glycérides du jaune d'oeuf servent à l'élaboration de ses différents composés lipidiques (lipoprotéines cellulaires, en particulier).

II - LES LIPOPROTEINES

On sait, depuis les travaux de HOPPE - SEYLER (1865) (57) que la majeure partie des lipides est présente dans le jaune d'oeuf sous la forme de complexes (cenapses), avec des protéines. Les macromolécules lipoprotéiques, d'une grande fragilité, assurent aux lipides un caractère hydrophile, les maintenant en solution.

A - PREPARATION

La première méthode de préparation de ces complexes lipoprotéiques a été proposée par OSBORNE et CAMPBELL en 1900 (58).

Modifiant cette méthode de fractionnement, CHARGAFF (1942) (59) a isolé, après dilution du jaune par le chlorure de sodium, délipidation à l'éther dialyse et centrifugation : la lipovitelline.

L'extraction à l'alcool de ce composé conduit à :

- . Une partie protéique : la vitelline , représentant 18 % du complexe,
- . Une partie lipidique : constituée essentiellement par des phospholipides, représentant 54 % à 62 % des phospholipides du jaune.

ALDERTON et FEVOLD (1945) (60) ont préparé par ultracentrifugation du jaune d'oeuf dilué, un complexe lipoprotéique présentant des caractéristiques voisines de celles décrites par CHARGAFF , qu'ils ont identifié à la lipovitelline.

Après extraction étherée du surnageant obtenu précédemment, FEVOLD et LAUSTEN (1946) (61) ont isolé et étudié un complexe lipoprotéique différent par ses propriétés de la lipovitelline : la lipovitellénine.

Par une méthode différente, SHEPPARD et HOTTLE (1949) (62) ont obtenu un complexe aux propriétés comparables à celles de la lipovitellénine.

LEA et HAWKE (1952) (63) ont proposé des modifications aux techniques de préparation de la lipovitellénine.

VANDEGAER, RICHMAN et COOK (1956) (64) utilisant l'ultracentrifugation, ont distingué deux fractions :

- . L'une de faible densité appelée L. D. F. (Low Density Fraction),
- . L'autre de densité plus élevée appelée H. D. F. (High Density Fraction).

SUGANO (1957) (65) a suggéré la présence de 3 constituants majeurs dans le jaune d'oeuf :

- . Deux lipovitellines : α et β
- . Une phosphoprotéine : la phosvitine (qui sera étudiée plus loin). (p. 54)

Pour cet auteur, la lipovitellénine de FEVOLD et LAUSTEN (1946) (66) n'est autre que la β lipovitelline.

JOUBERT et COOK (1958) (67) ont mis au point une méthode de préparation d'une lipovitelline pure, par précipitation au sulfate de magnésium.

SCHJEIDE et URIST (1959) (68) , après ultracentrifugation du jaune d'oeuf, ont obtenu deux fractions :

- . L'une "fluide" , contenant, selon eux, deux constituants, l'un de faible densité, l'autre de densité supérieure,

• L'autre plus dense ("granules") contenant deux constituants :

- Une phosphoprotéine : la phosvitine,
- Un complexe lipoglycoprotéinique présentant les caractéristiques de l' α lipovitelline décrite par SUGANO.

Les auteurs ont donc ainsi mis en évidence 4 constituants dans le jaune d'oeuf.

BERNARDI et COOK (1960) (69) ont décrit un plan général de fractionnement du jaune, basé sur les observations faites par VANDEGAER et Coll (1956) (70), JOUBERT et COOK (1958) (71) ainsi que sur celles de MARTIN et COOK (1958) (72).

Le schéma de ce plan de fractionnement est repris à la Figure 1 (p. 16).

La même année, BERNARDI et COOK (1960) (73) ont soumis la fraction la plus dense (H. D. F.) à une chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite. Ce procédé conduit en particulier à la préparation des lipovitellines α et β . Par ailleurs, on obtient les livétines, constituants étudiés plus loin (p. 36), ainsi que la phosvitine.

A partir de ces observations et de celles faites par BURLEY et COOK (1961) (74), COOK (1961) (75) a décrit un procédé général de fractionnement du jaune, dans lequel l'utilisation du sulfate de magnésium est abandonnée. Ce procédé permet de mettre en évidence sept constituants dans le jaune d'oeuf. Il est schématisé à la Figure 2 (p. 17).

B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE

Les différents composés isolés sont étudiés par les auteurs au moyen de deux techniques principales :

- L'ultracentrifugation d'une part,
- L'électrophorèse d'autre part,

Pour ce qui est de l'électrophorèse, de nombreux travaux ont utilisé l'électrophorèse libre :

- SHEPPARD et HOTTLE (1949) (76) ont mis en évidence l'homogénéité de la lipovitellénine qu'ils ont isolée.

- YOUNG et PHINNEY (1951) (77) ont appliqué cette technique au jaune d'oeuf extrait à l'éther. Ils ont obtenu un diagramme composé de trois pics, dont un pic majeur représentant l'ensemble des lipoprotéines.

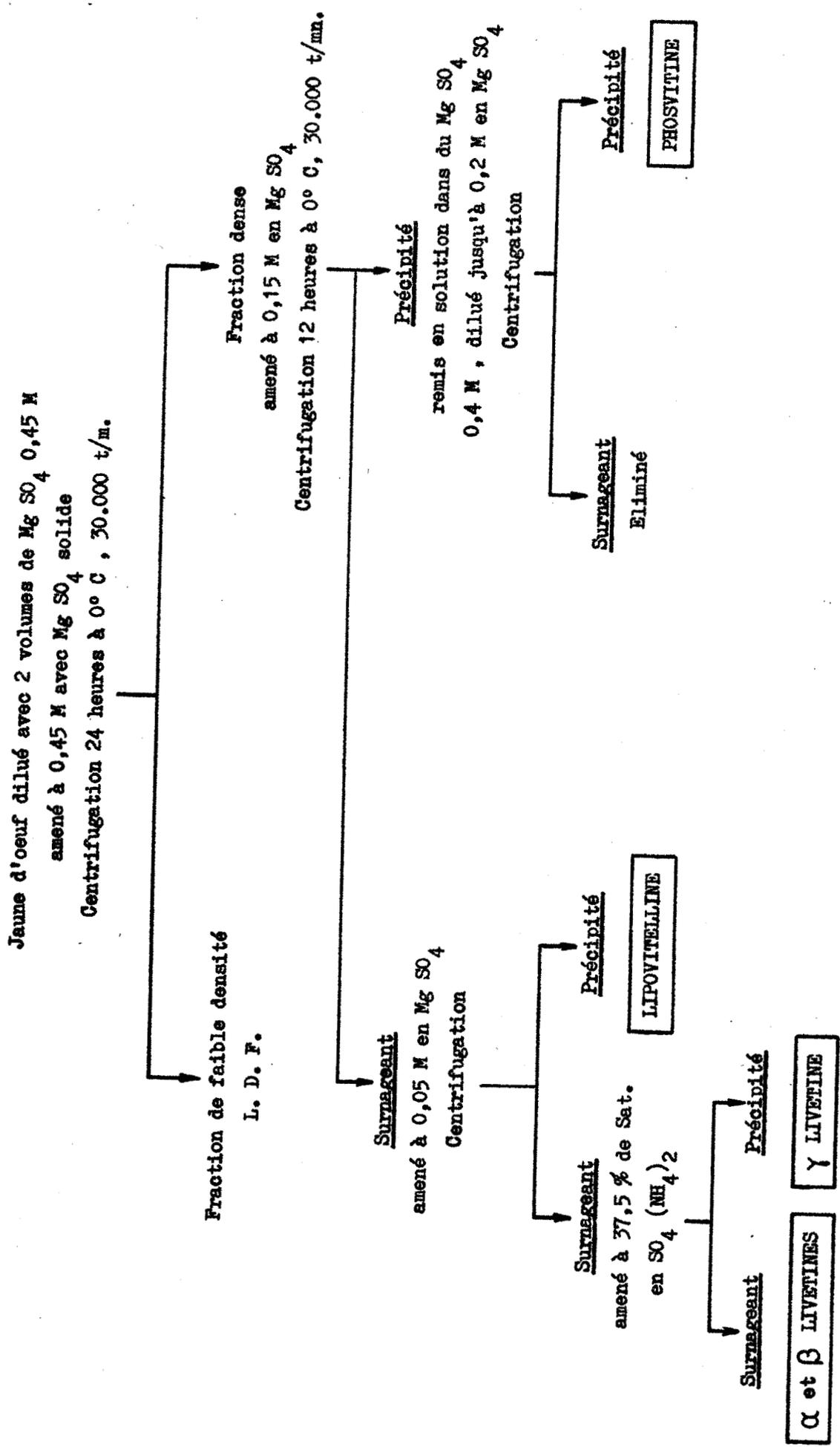


Figure 1
 Schéma de Fractionnement du Jaune d'Oeuf
 Selon JOUBERT et COOK (1960) (69)



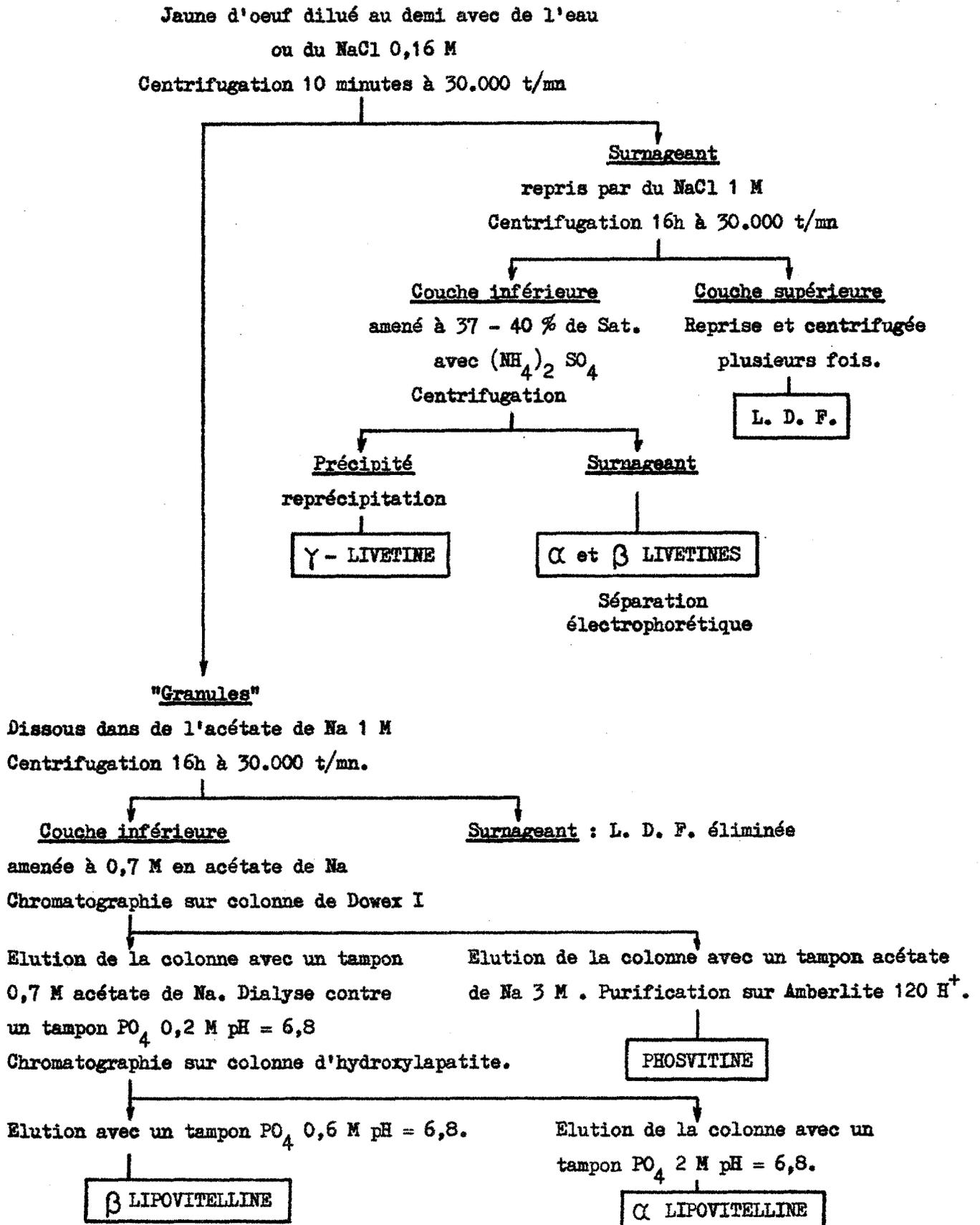


Figure 2.

Schéma Général de Fractionnement du Jaune d'Oeuf
Selon COOK (1962) (75)



- SUGANO (1957) (78) a montré l'hétérogénéité de la lipovitelline et a étudié le comportement électrophorétique de la phosvitine. Le même auteur (1959) (79) a précisé l'influence du pH et de la force ionique du tampon sur le comportement électrophorétique de la lipovitelline. Les variations observées ont été attribuées aux liaisons que forment les ions du tampon avec les molécules protéiques.

- JOUBERT et COOK (1958) (80) ont soumis, à l'électrophorèse libre, la lipovitelline purifiée qu'ils ont préparée.

- BERNARDI et COOK (1960) (81) après avoir montré l'hétérogénéité de la fraction dense obtenue par centrifugation (H. D. F.), ont étudié le comportement électrophorétique de chacun des constituants. L'électrophorèse libre leur a permis, dans certaines zones de pH, de séparer la lipovitelline en ses deux composantes α et β .

Ces travaux ont été repris par TATPRIE et COOK (1968) (82).

L'électrophorèse de zone a été employée, dès 1953, par MAC KINLEY et Coll (83).

- EVANS et BANDEMER (1957) (84) ont soumis le jaune d'oeuf à l'électrophorèse sur papier. L'électrophorégramme comporte 7 bandes et les auteurs en ont attribué 3 aux lipoprotéines. Ils ont montré également que le schéma électrophorétique obtenu est modifié par l'extraction à l'éther du matériel étudié, l'éther causant la rupture des liaisons lipides - protéines.

- STEVEN (1961) (85) a montré que les constituants du jaune d'oeuf pouvaient être séparés par électrophorèse en gel d'amidon mais n'a donné aucune interprétation des électrophorégrammes obtenus.

- MAC CULLY et Coll (1959) (86) (1962) (87) ont utilisé l'électrophorèse sur papier et analysé le jaune d'oeuf dilué, la fraction dense (H. D. F.) et la fraction légère (L. D. F.). Ils ont montré la présence d'un complexe lipoprotéine - phosvitine, complexe détruit par dilution du jaune ou traitement par des agents complexants. Les électrophorèses réalisées ont amené les auteurs à penser que la livétine γ , mal séparée du complexe lipoprotéine - phosvitine, fait également partie de ce complexe.

- SEZILLE (1964) (88) a établi une description de l'électrophorégramme global du jaune d'oeuf dilué. Pour ce faire, l'auteur a utilisé deux procédés :

• La révélation des électrophorogrammes par des colorations spécifiques

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| - Protéines | : vert de liasamine, |
| - Lipoprotéines | : noir Cerol, |
| - Glycoprotéines | : coloration au P. A. S., |
| - Mucopolysaccharides acides | : bleu alcian, |
| - Phosphoprotéines | : réaction du phosphore. |

• L'étude électrophorétique des fractions isolées par des procédés chimiques

L'électrophorogramme obtenu, soumis à l'enregistrement densitométrique, est repris à la Figure 3 (p. 20).

L'étude réalisée par cet auteur a montré que la lipovitelline et la lipovitellénine sont des lipo-glycoprotéines, très riches en lipides. Ces deux complexes ont des mobilités voisines, la lipovitellénine étant légèrement plus rapide et le front de migration de ce constituant ayant, par ailleurs, une vitesse de migration égale à celle de la livétine γ .

La phosvitine, phosphoprotéine libérée des complexes qu'elle forme avec les lipoprotéines, possède une grande vitesse de migration. Elle est colorable au bleu alcian.

Enfin, l'électrophorogramme permet la mise en évidence des livétines α , β , γ , composés obtenus par les procédés généraux de fractionnement du jaune d'oeuf, décrits plus haut.

C - LES COMPLEXES : LIPOVITELLINES et LIPOVITELLENINE

Les complexes lipoprotéiques représentent environ 85 % des solides du jaune d'oeuf (COOK - 1962) (89).

Les lipoprotéines totales comprennent :

- 22 % de lipovitelline,
- 78 % de lipovitellénine.

Tous les lipides sont compris dans ces deux complexes.

1° - LES LIPOVITELLINES

Nous savons que les lipovitellines font partie de la fraction la plus dense (H. D. F.) obtenue par centrifugation du jaune selon BERNARDI et COOK (1960) (90).

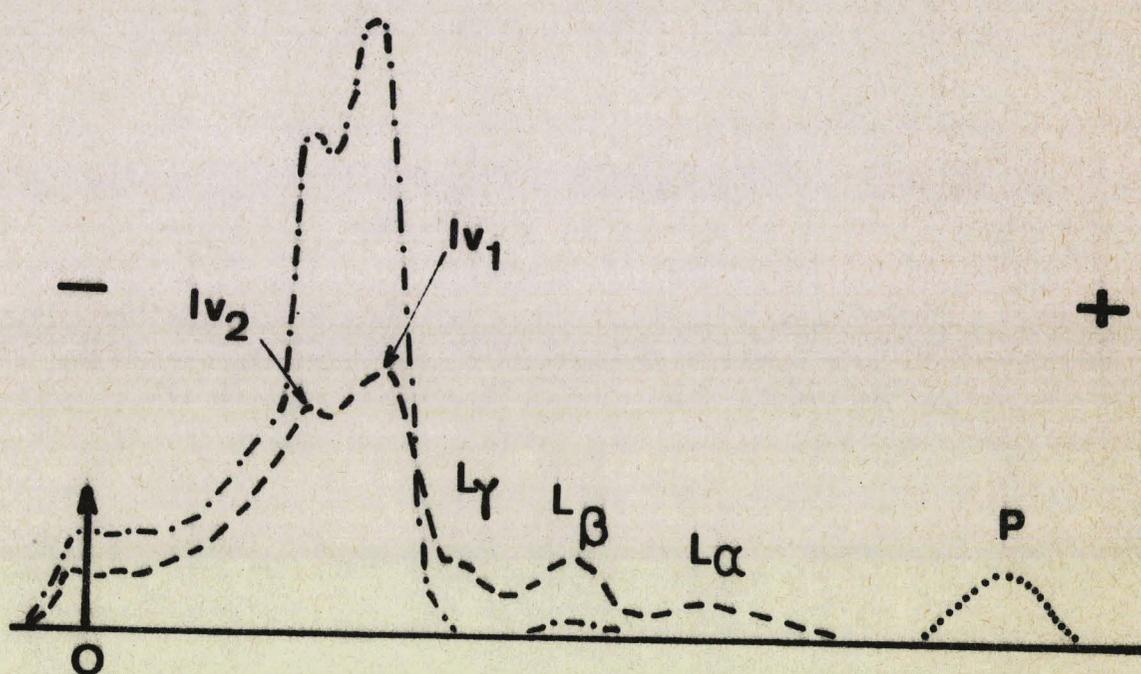


Figure 3

Enregistrement densitométrique de l'électrophorèse
du jaune d'oeuf dilué - SEZILLE (1964) (88).

Électrophorèse sur papier en tampon véronal de pH 8,6

----- : protéinogramme ; - - - - - : lipidogramme ; : bleu alcian.

P : phosvitine ; L : livétines ; lv_1 : lipovitellénine ; lv_2 : lipovitelline.

Les mêmes auteurs (1960) (91) ont préparé les lipovitellines α et β par chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite.

WALLACE (1965) (92) TATTRIE et COOK (1968) (93), ont proposé un procédé de préparation de ces deux constituants par chromatographie sur TEAE - Cellulose.*

Selon COOK (1962) (94) le complexe lipovitellénique représente 16,3 % des solides du jaune d'oeuf, répartis ainsi :

- . Lipovitelline α : 6,0 %.
- . Lipovitelline β : 10,3 %.

On attribue un poids moléculaire de 400.000 pour chaque constituant :
COOK (1961) (95) PARKINSON (1966) (96).

a) La partie lipidique

La composition globale en lipides des complexes lipovitelléniques a été donnée par BERNARDI et COOK (1960) (97), BURLEY et COOK (1961) (98), ITO et FUJI (1962) (99), MARTIN et Coll (1963) (100). SEZILLE (1964) (101) a donné une répartition moyenne pour la lipovitelline.

TATTRIE et COOK (1968) (102), ont proposé une répartition moyenne des lipides pour les lipovitellines α et β , reprise au Tableau VI (p. 22).

En accord avec EVANS et BANDEMER (1961) (103) remarquons que les phosphatides de la lipovitelline sont essentiellement constitués de lécithines.

La composition en acides gras a été également étudiée :

SCHJEIDE (1963) (104) a donné la composition centésimale en acides gras des lipides totaux de la lipovitelline.

EVANS et BANDEMER (1961) (105), après extraction des lipides du complexe lipovitellénique, séparation par chromatographie sur colonne en lipides neutres, céphalines et lécithines, ont déterminé la composition en acides gras des trois fractions.

SEZILLE (1964) (106) a donné la composition en acides gras des glycérides totaux et phosphatides totaux présents dans la lipovitelline.

Au Tableau VII (p. 23) figurent les résultats obtenus par TATTRIE et COOK (1968) (107).

* TEAE - Cellulose : triéthylaminoéthylcellulose.

Tableau VI
Composition Lipidique des Lipovitellines
TATTRIE et COOK (1968) (102)

Constituants	Lipovitelline α	Lipovitelline β
<u>Lipides</u> (% en complexe)	22	26
<u>Lipides Neutres</u> (% des lipides)	40,1	37,5
<u>Phospholipides</u> (% des lipides)	59,9	62,5
. Sphingomyélines)		
. Lysolécithines)	4,2	4,12
. Lécithines	<u>45,16</u>	<u>47,70</u>
. Céphalines	10,54	10,68



Tableau VII
Composition en Acides Gras des Lipides des Lipovitellines α et β
TATTRIE et COOK (1968) (107)

Acides Gras en %	Palmitique 16 : 0	Stéarique 18 : 0	Palmitoléique 16 : 1	Oléique 18 : 1	Linoléique 18 : 2	Arachidonique 20 : 4
α <u>Lipovitelline</u>						
- Lipides neutres	30,3	13,3	2,1	42,0	12,3	1,0
- Céphalines	20,1	35,9	1,5	21,4	10,3	8,1
- Lécithines	33,4	11,8	2,0	38,5	12,5	1,9
β <u>Lipovitelline</u>						
- Lipides neutres	25,2	8,7	3,5	53,8	8,8	1,0
- Céphalines	18,7	37,0	1,3	23,5	9,1	10,4
- Lécithines	32,4	11,7	1,7	33,7	16,6	4,0



Ces auteurs ont déterminé la composition en acides gras des différents constituants lipidiques, séparément, et cela, pour les lipovitellines α et β . Il est possible, à partir de ces chiffres et de la composition globale en lipides de retrouver la teneur en acides gras de chaque complexe.

b) La partie protidique

Aux complexes lipovitelléniques correspondent deux protéines de base : les vitellines α et β .

. Préparation

Vraisemblablement les premiers, PLIMMER et SCOTT (1908) (108) ont préparé la vitelline, en traitant le complexe lipoprotéique par la soude à 1 %, à 37° C pendant 24 - 48 heures.

CHARGAFF (1942) (109), a poursuivi sa préparation de la lipovitelline par une extraction continue à l'alcool afin d'éliminer les lipides du complexe et a obtenu ainsi la vitelline.

EVANS et BANDEMER (1961) (110), ont isolé les complexes lipovitelléniques puis extrait, à l'éther, les lipides peu liés, et à l'alcool les lipides fortement liés, obtenant ainsi les protéines correspondantes.

COOK et Coll (1962) (111), ont fait une délipidation des complexes lipoprotéiques par la méthode décrite par BLIGH et DYER (1959) (112).

Il faut noter, en accord avec SEZILLE (1964) (113) que pour dissocier les cénapses, les agents physiques de séparation sont inopérants et qu'il est nécessaire d'utiliser des agents chimiques : alcool, éther, chloroforme.

Ce dernier a fait d'ailleurs une étude comparative des méthodes d'extraction des lipides.

. Composition

Du point de vue de l'analyse élémentaire, la vitelline a été étudiée par CHARGAFF (1942) (114) ALDERTON et FEVOLD (1945) (115).

MARTIN, TATTRIE et COOK (1963) (116) ont confirmé qu'il s'agit pour les vitellines α et β de phosphoprotéines et ont donné les chiffres inscrits au Tableau VIII (p. 25).

Tableau VIII
Composition en Azote et en Phosphore des Vitellines α et β
D'après MARTIN, TATTRIE et COOK (1963) (116)

Constituant	Azote %	Phosphore %
Vitelline α	15,5	0,64
Vitelline β	15,8	0,34



La β vitelline est donc moins riche en phosphore que l' α vitelline.

La composition en acides aminés a été rapportée également, LEWIS et Coll (1950) (117), utilisant une méthode microbiologique de dosage des acides aminés, ont donné la composition de la vitelline.

FEVOLD (1951) (118) a repris ce travail. Des résultats plus précis ont été obtenus par BERNARDI et COOK (1960) (119) qui ont donné les compositions en acides aminés de chacune des protéines de base : vitellines α et β . Les résultats de COOK et Coll (1962) (120) sont repris au Tableau IX (p. 27). Selon ces auteurs, après interprétation statistique des résultats qu'ils ont obtenus, il n'y a pas de différence significative de point de vue de la composition en acides aminés entre les vitellines α et β , si ce n'est une teneur plus faible en histidine dans la vitelline β .

. Structure

Dès 1901, LEVENE et ALSBERG (121) utilisant l'ammoniaque à 12 % pour hydrolyser la vitelline, ont obtenus un phosphopeptide : l'acide vitellinique, contenant environ 9 % de phosphore et, en outre, 0,6 % de fer.

SWIGEL et POSTERNAK (1927) (122) (123) ont obtenu, par hydrolyse enzymatique quatre peptides dont les compositions sont données au Tableau X (p. 28) : il s'agit des ovotyrines.

Ayant mis en évidence dans les ovotyrines, en particulier, l'acide sérine-phosphorique ces auteurs ont pensé que le phosphore est présent dans la vitelline sous la forme de ce composé.

POSTERNAK et WAEGELL (1964) (124) reprenant ces travaux ont isolé un peptide dont ils ont établi la composition en acides aminés. Ce peptide contient également l'acide sérine-phosphorique.

Les acides aminés N - Terminaux de la vitelline sont proposés par NEELIN et COOK (1961) (125) (126). Il s'agit, selon ces auteurs, de l'arginine et de la lysine.

2° - LA LIPOVITELLENINE

La lipovitellénine, isolée par FEVOLD et LAUSTEN(1946) (127) correspond à la fraction de faible densité ($\rho = 0,98$) isolée par l'ultra-centrifugation de la L. D. F. Utilisant une méthode différente, MARTIN et Coll (1964) (128) ont obtenu

Tableau IX
Composition en Acides Aminés des Vitellines α et β
COOK et Coll (1962) (120)

Acides Aminés en mmoles/g de protéine	Vitelline α	Vitelline β
Acide aspartique	0,60	0,67
Acide glutamique	0,82	0,86
Arginine	0,47	0,52
Histidine	0,19	0,15
Lysine	0,50	0,51
Alanine	0,63	0,61
Cystine / 2	0,12	0,13
Glycocolle	0,38	0,38
Isoleucine	0,45	0,49
Leucine	0,70	0,73
Méthionine	0,19	0,21
Phénylalanine	0,27	0,25
Proline	0,43	0,44
Sérine	0,54	0,51
Thréonine	0,35	0,36
Tryptophanne	0,13	0,13
Tyrosine	0,23	0,25
Valine	0,56	0,61



Tableau X
 Composition des Peptides Obtenus par Hydrolyse Enzymatique de la Vitelline
 Selon SWIGEL et POSTERNAK (1927) (122) (123)

Peptides	Azote %	Phosphore %	Fer %
Ovotyrine α	10,9	13,8	-
Ovotyrine β_1	11,3	12,6	-
Ovotyrine β_2	10,9	12,1	3,3
Ovotyrine γ	10,7	7,9	-



deux constituants à partir de la L. D. F. :

- La L. D. F.₁ pour 1/5 de la L. D. F.,
- La L. D. F.₂ pour laquelle ils ont obtenu des caractéristiques physico-chimiques différentes.

Poursuivant son investigation, la même équipe de chercheurs (1964) (129) a préparé, par extraction étherée de la L. D. F., L. D. F.₁ et L. D. F.₂, 5 composés de nature lipoprotéique et a proposé un schéma de structure du complexe lipovitelléninique.

TATTRIE et COOK (1968) (130), ont repris ces travaux et précisé les résultats obtenus. Selon COOK (1961) (131), le poids moléculaire de la lipovitellénine serait de 4.800.000.

a) La partie lipidique

La lipovitellénine contient 89 % de lipides (COOK - 1962) (132), elle est donc beaucoup plus riche en lipides que la lipovitelline (22 %).

La composition globale en lipides de la lipovitellénine a été donnée par :

- Mc INDOE (1959) (133),
- SCHLEIDE et URIST (1959) (134),
- EVANS et BANDEMER (1961) (135),
- SUGANO et WATANABE (1961) (136),
- MARTIN et Coll (1963) (137),
- SEZILLE (1964) (138).

Les résultats obtenus par TATTRIE et COOK (1968) (139), figurent au Tableau XI (p. 30).

On note donc un taux élevé de lipides neutres constitués essentiellement de glycérides (70 % des lipides), et de cholestérol (4,2 % des lipides) SEZILLE (1964) (140). Selon ce dernier, les résultats peuvent présenter des discordances d'une préparation à l'autre, les conditions opératoires dénaturent, en effet, partiellement, ce complexe extrêmement fragile.

La composition en acides gras, fait l'objet de peu de travaux. Les résultats obtenus par TATTRIE et COOK (1968) (141), figurent au Tableau XII (p. 31).

Tableau XI
 Composition Lipidique Globale de la L. D. F.
 Selon TATTRIE et COOK (1968) (139)

Constituants	Lipovitellénine
<u>Lipides</u> (% du complexe)	89
<u>Lipides Neutres</u> (% des lipides)	74,2
<u>Phospholipides</u> (% des lipides)	25,8
- Sphingomyélines)	
- Lysolécithines)	9,2
- Lécithines	71,0
- Céphalines	19,8



Tableau XIII
 Composition en Acides Gras des Lipides de la Lipovitelline
TATURIE et COOK (1968) (141)

Acides gras en %	Palmitique	Stéarique	Palmitoléique	Oléique	Linoléique	Arachidonique
L. D. F.	3,0	27,2	9,2	49,7	9,1	1,0



b) La partie protidique

La vitellénine est la protéine de base du complexe lipovitelléninique.

. Préparation

Les méthodes décrites à propos de la vitelline sont valables pour préparer la vitellénine, protéine de base de la lipoprotéine, à partir du complexe lipovitelléninique.

. Composition

Pour ce qui est de l'analyse élémentaire, la vitellénine a été étudiée par FEVOLD et LAUSTEN (1946) (142). MARTIN, TATTRIE et COOK (1963) (143) ont repris ces travaux et confirmé que la vitellénine est une phosphoprotéine, qui renferme 14 % d'azote et 0,04 à 0,11 % de phosphore. Cette faible teneur en phosphore distingue la vitellénine des vitellines.

COOK et Coll (1962) (144) ont isolé la vitellénine par délipidation, à l'aide de la méthode de BLIGH et DYER (1959) (145), en ont déterminé sa composition en acides aminés : Tableau XIII (p. 33).

Selon NEELIN et COOK (1961) (146) les acides aminés N - Terminaux sont les mêmes que pour les vitellines : Arginine et Lysine.

Les travaux d'ABRAHAM et Coll (1960) (147) ont montré que la lipovitellénine est de nature lipo - glycoprotéinique. Selon ces auteurs, la composition en glucides est la suivante :

- . Oses : 1,3 %,
- . Osamines : 0,67 %,
- . Acides Sialiques : 0,3 %.

La nature glycoprotéinique de la lipovitellénine a été confirmée par SEZILLE (1964) (148) qui a obtenu des électrophorogrammes P.A.S. positifs.

Pour terminer cette description de la lipovitellénine, il convient de rappeler le plan de structure du complexe proposé par AUGUSTINIAK, MARTIN et COOK (1964) (149) d'une part, par TATTRIE et COOK (1968) (150) d'autre part, selon ces auteurs, les lipides neutres occupent le centre de la molécule, phospholipides et protéines étant situés à la périphérie du complexe lipovitelléninique.

Ces conclusions s'appuient sur les observations rapportées plus haut ainsi que sur les données obtenues en traitant le complexe par les enzymes : phospholipase, protéase, (TATTRIE et COOK - 1968) (151).

Tableau XIII
 Composition en Acides Aminés de la Vitellénine
COOK et Coll (1962) (144)

Acides Aminés en mmoles/g de protéine	Vitellénine
Acide aspartique	0,80
Acide glutamique	0,80
Arginine	0,36
Histidine	0,11
Lysine	0,60
Alanine	0,54
Cystine / 2	0,01
Glycocolle	0,36
Isoleucine	0,47
Leucine	0,79
Méthionine	0,15
Phénylalanine	0,32
Proline	0,26
Sérine	0,51
Thréonine	0,40
Tryptophanne	0,13
Tyrosine	0,26
Valine	0,49



D - LIPOPROTEINES DU JAUNE D'OEUF ET DU SERUM DE POULE

Les rapports entre les lipoprotéines du jaune d'oeuf et celles du sérum de poule ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux : LASKOWSKI (1935) (152), Mc KINLEY et Coll (1954) (153), VANSTONE et Coll (1955) (154).

- FLICKINGER (1956) (155) injectant du phosphore radio-actif à la poule en période de ponte, a constaté, tout d'abord, un stockage au niveau du foie puis une apparition de phosphore marqué dans les protéines sériques et enfin dans le jaune d'oeuf en formation.

- Mc INDOE (1959) (156) a signalé que le sérum de poule, en période de ponte, contient un taux important de glycérides ainsi que de la vitelline.

- SCHJEIDE et URIST (1956) (1959) (1960) (157) (158) (159) ont isolé les protéines du sérum de poule et ont retrouvé ces constituants dans le jaune d'oeuf.

- Enfin SCHJEIDE (1963) (160) a montré que, sous l'action des oestrogènes, le foie de la poule synthétise des lipoprotéines qui passent dans le sang et se déposent dans le jaune d'oeuf.

Provenant d'un transfert mécanique, les lipoprotéines du jaune sont donc le reflet des lipoprotéines sériques de la poule en période de ponte (SEZILLE - 1964) (161).

2 - LA FRACTION HYDROSOLUBLE

Il a été vu plus haut que, selon COOK (1962) (162), les complexes lipoprotéiques du jaune d'oeuf représentent environ 85 % des solides du jaune. Les solides hydrosolubles représentent donc 15 % des solides du jaune.

I -- LES LIVÉTINES

C'est PLIMMER (1908) (163), qui pour la première fois, en préparant la lipovitelline par la méthode d'OSBORNE et CAMPBELL (1900) (164), a signalé la présence, dans le surnageant aqueux, résultant du fractionnement, d'une protéine coagulable par la chaleur. Il a proposé pour cette protéine le nom de "livétine".

KAY et MARSHALL (1928) (165), ont repris l'étude de cette protéine et montré qu'il s'agit en fait d'un mélange de plusieurs constituants : les livétines.

A -- PREPARATION

Deux types de méthodes sont à envisager :

1° - LES METHODES GENERALES DE PREPARATION

Il a été vu plus haut que les procédés généraux de fractionnement du jaune d'oeuf de poule, proposés par EVANS et BANDEMER (1957) (166), BERNARDI et COOK (1960) (167), COOK (1962) (168), permettent, en outre, de préparer les livétines.

2° - LES METHODES PARTICULIERES DE PREPARATION

- KAY et MARSHALL (1928) (169), ont préparé les livétines par précipitation au sulfate d'ammonium à demi-saturation et extraction avec un mélange d'alcool et d'éther à - 15° C, après avoir éliminé les lipoprotéines. Par ce procédé, ils ont réussi à préparer les livétines sans les dénaturer.

- SHEPPARD et HOTTLE (1949) (170), ont décrit deux techniques de préparation des livétines.

. Dans la première, les lipoprotéines sont précipitées par dilution du jaune avec deux volumes de chlorure de sodium à 0,85 %, en présence d'éther. La phase aqueuse obtenue est extraite à l'éther et enfin les lipoprotéines résiduelles précipitent, lors de l'évaporation de l'éther, la solution obtenue contenant les livétines.

. Dans la seconde méthode, les lipoprotéines sont également précipitées par dilution du jaune avec du chlorure de sodium à 0,85 % et, par dialyse contre cette même solution. Après dialyse, lipides libres et lipoprotéines résiduelles se séparent quand le pH est ajusté à 6. Les livétines préparées par cette méthode renferment des lipides extractibles.

- Une technique est proposée par KNIGHT et SCHECHTMAN (1954) (171) , dans laquelle chaque jaune d'oeuf est additionné de 10 ml de NaCl à 10 %. Après homogénéisation, le liquide visqueux obtenu est extrait à l'éther jusqu'à ce que la phase étherée soit incolore. La phase aqueuse est alors dialysée contre une solution de NaCl à 0,9 %, dialyse au cours de laquelle la majeure partie de l'éther est éliminée. Le contenu du sac à dialyse est centrifugé et la phase aqueuse, surnageante est lyophilisée, après dialyse destinée à éliminer l'éther résiduel.

- La méthode de préparation décrite par MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (172), comporte les étapes suivantes :

. Les jaunes sont séparés du blanc d'oeuf et ponctionnés à travers la membrane vitelline. Le jaune d'oeuf obtenu est dilué avec trois volumes d'eau distillée et le précipité de lipovitelline est éliminé par centrifugation. Le surnageant est émulsionné avec un volume d'éther éthylique à - 20° C en ampoule à décanter.

. Après quelques heures de repos, la phase inférieure aqueuse, renfermant les livétines, est séparée de la phase intermédiaire contenant la lipovitellénine et de la phase supérieure étherée lipidique. Elle est extraite à l'éther à - 20° C puis dialysée et lyophilisée.

Selon les auteurs, une autre méthode peut être employée, qui fournit des résultats tout à fait comparables : cette technique consiste à émulsionner le jaune avec deux volumes d'eau distillée et deux volumes de tétrachlorure de carbone. La phase aqueuse est extraite à nouveau, dialysée contre de l'eau distillée et lyophilisée.

Ces méthodes de préparation sont reprises dans l'exposé des travaux personnels (voir p. 96).

B - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

1° - PROPRIETES PHYSIQUES

a) Comportement électrophorétique

1. L'électrophorèse libre :

SHEPARD et HOTTLE (1949) (173) ont soumis les préparations de livétines qu'ils ont obtenues à l'électrophorèse libre en tampon phosphate de pH 7,95 et de force ionique 0,1.

Ils ont obtenu un diagramme composé de 5 pics mais leurs résultats ne sont pas reproductibles du fait de la présence de lipides non extraits dans leurs préparations.

L'analyse électrophorétique réalisée par GORINI et LANZAVECCHIA (1955) (174) en tampon phosphate de pH 7,8 et de force ionique 0,1 révèle la présence de trois constituants majeurs : F_1 , F_2 , F_3 et d'une quatrième fraction de mobilité intermédiaire de celles des fractions F_2 et F_3 que les auteurs appellent F_2 bis.

A l'aide de la même technique, MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (175), ont étudié le diagramme donné par les livétines qu'ils ont préparées. Les expériences sont réalisées en tampon phosphate de force ionique 0,1 et de pH 8,0.

Dans ces conditions, l'électrophorèse libre révèle trois constituants majeurs que les auteurs appellent α , β et γ de mobilités respectives :
 $- 6,3 \cdot 10^{-5}$, $- 3,8 \cdot 10^{-5}$, et $- 2,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$.

Cette donnée est confirmée par l'ultracentrifugation.

BERNARDI et COOK (1960) (176) ont également appliqué cette technique aux protéines du jaune et ont retrouvé les trois constituants de la fraction "livétines".

2. L'électrophorèse de zone

Mc CULLY et Coll (1959) (1962) (177) (178) ont soumis les livétines et le jaune d'oeuf dilué (2 : 5 v/v) avec du NaCl à 1 % à l'analyse électrophorétique sur papier. Ils ont utilisé un tampon véronal de pH 8,6 , et de force ionique 0,05.

WILLIAMS (1962) (179) a utilisé également cette technique. A différents pH (5,4 : 6,5 : 8,6 : 10,0), les électrophorégrammes montrent la présence de trois bandes, migrant vers l'anode, que l'auteur a attribué aux constituants α , β et γ en accord avec les résultats obtenus par Mc CULLY et Coll.

Par ailleurs, confirmant ceux de KNIGHT et SCHECHTMAN (1954) (180), WILLIAMS a précisé qu'il est possible, dans certains cas, d'obtenir une bonne résolution de la bande correspondant au constituant le plus lent, en deux composants :

- . L'un étant la transferrine ou conalbumine,
- . L'autre, la livétine γ proprement dite.

Cet auteur a utilisé aussi l'électrophorèse en gel d'amidon horizontal, appliquant la technique décrite par SMITHIES (1955) (181), à l'aide d'un système

tampon discontinu mis au point par POULIK (1957) (182).

SEZILLE (1964) (183), a employé l'électrophorèse en gel d'amidon vertical, selon la technique de WILLIAMS, parallèlement à l'électrophorèse sur papier, en tampon barbital de pH 8,6 et de force ionique 0,1, et en tampon pyridine de pH 3,9. Les électrophorégrammes sont révélés par différentes techniques, dont celle au P. A. S. qui permet de mettre en évidence la nature glycoprotéinique des livétines.

Enfin, CHI CHING MOK et COMMON (1964) (184), reprenant ces travaux, ont comparé les électrophorégrammes obtenus d'une part, en tampon barbital (pH 8,6 ; force ionique 0,05), et d'autre part en tampon barbital, acétate de sodium (pH 8,6 ; force ionique 0,07). Ils ont confirmé les résultats selon lesquels il est possible de séparer partiellement deux constituants dans la bande la plus lente (livétine γ) qu'ils ont appelés γ_1 et γ_2 livétines.

Les enregistrements densitométriques des électrophorégrammes sont repris à la figure 4 (p. 40).

b) Analyse Immuno - Electrophorétique

L'immuno-électrophorégramme des livétines brutes proposé par WILLIAMS (1962) (185) est donné à la figure 5 (p. 41).

Cet auteur a utilisé la technique décrite par SCHEIDEGGER (1955) (186) à l'aide d'un gel d'agar à 1,5 % en tampon tétraborate de sodium, acide succinique, azide de sodium.

Il a obtenu ainsi six arcs de précipitation correspondant à six constituants antigéniques :

- . Une albumine,
- . Deux α_1 globulines,
- . Une globuline α_2 ,
- . La transferrine ou conalbumine,
- . Une γ globuline.

Un autre diagramme d'analyse immuno-électrophorétique est proposé par CHI CHING MOK et COMMON (1964) (187), figure 6 (p. 42). Il présente quatre arcs de précipitation majeurs (arcs 1, 3, 4 et 5) et deux arcs mineurs (arcs 2 et 6). L'analyse électrophorétique faite par ces auteurs révèle la présence de quatre constituants dans les livétines. Après avoir isolé par électrophorèse préparative, chacun de ces constituants, ils ont identifié les arcs obtenus en immuno-électrophorèse :

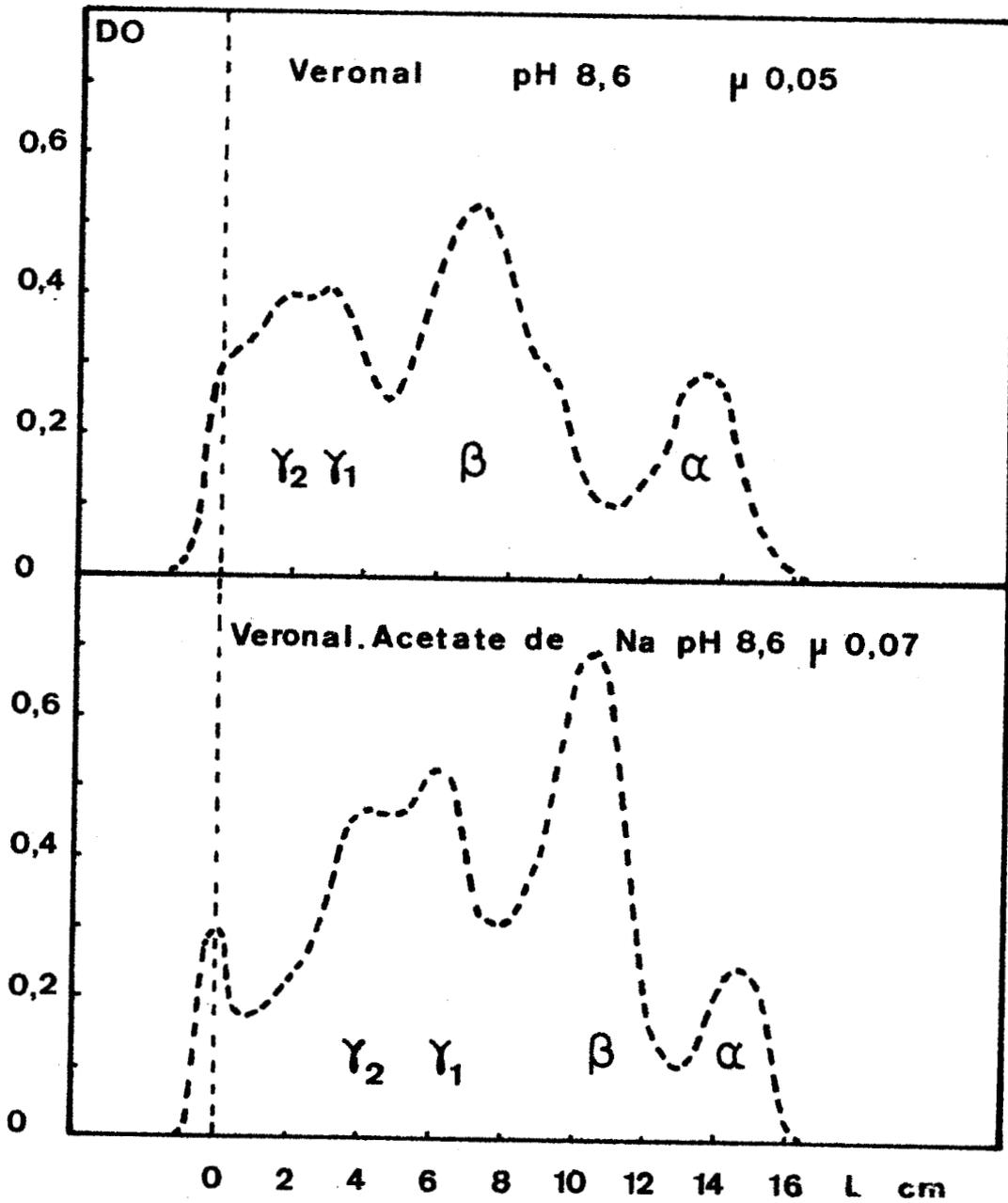


Figure 4

Enregistrements Densitométriques des Electrophorèses des Livétines

Selon CHI CHING MOK et COMMON (1964) (184)

(pour la signification des lettres grecques voir le texte p. 39)



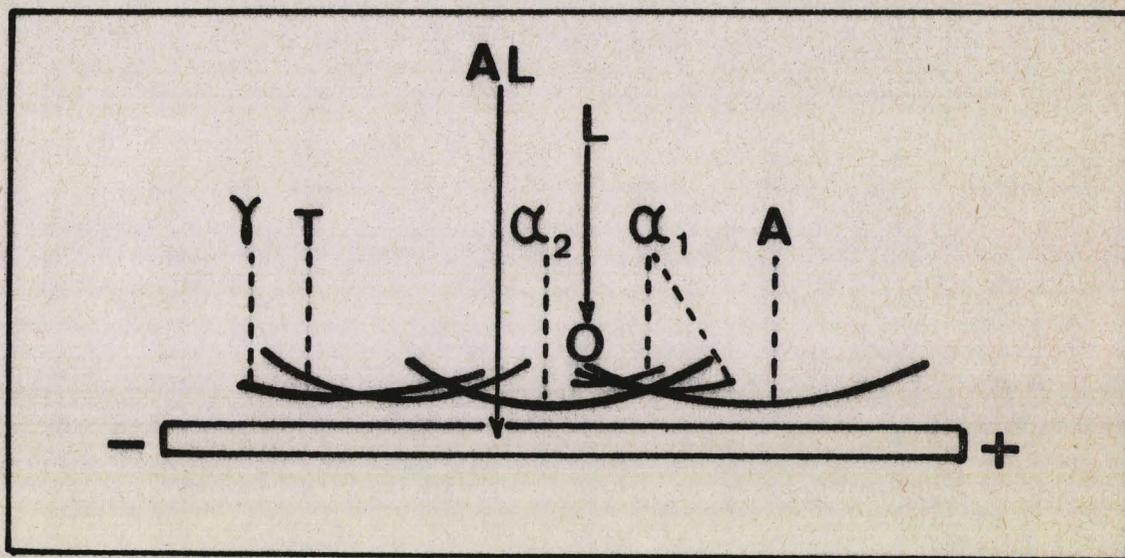


Figure 5

Immunoélectrophorégramme des Livétines

Selon WILLIAMS (1962) (185)

- A : Albumine
- α_1 : α_1 globuline
- α_2 : α_2 globuline
- T : Transferrine
- γ : γ globuline
- L : Livétines
- AL : Sérum anti-livétines.

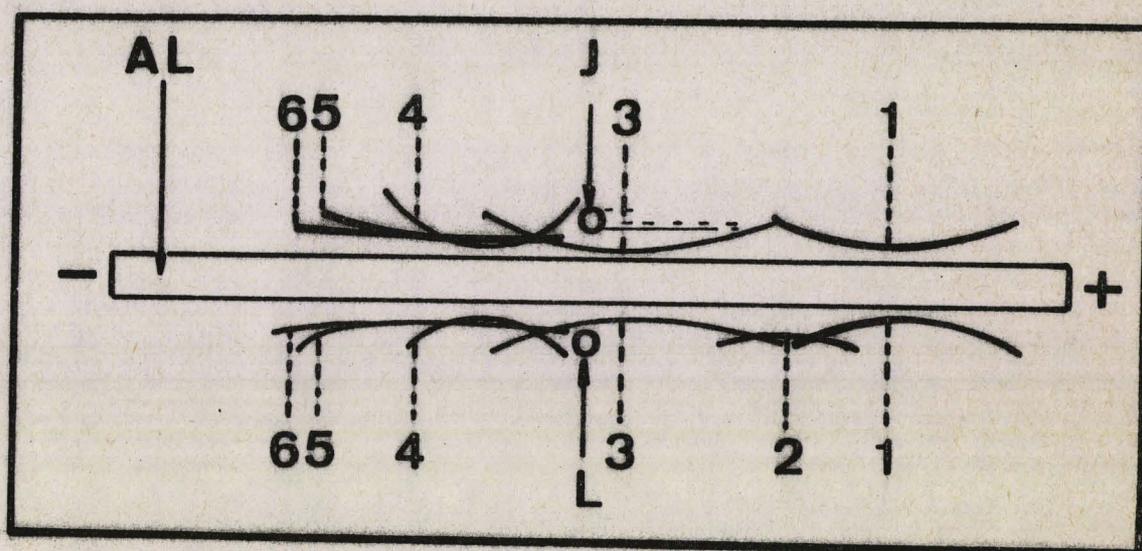


Figure 6

Immunoélectrophorégramme des Livétines
Selon CHI CHING MOK et COMMON (1964) (187)

- 1 : Livétine α
- 3 : Livétine β
- 4 : Livétine γ_1
- 5 : Livétine γ_2
- L : Livétines
- J : Jaune d'Oeuf
- AL: Sérum anti-livétines.



- . Les arcs 1 et 3 correspondent respectivement aux livétines α et β .
- . Les arcs 4 et 5 aux livétines γ_1 et γ_2 .

HUI et COMMON (1966) (188) ont montré à l'aide d'électrophorèses en gel d'amidon, que la livétine β est hétérogène, bien qu'elle ne donne qu'un seul arc en immunoélectrophorèse, correspondant à une seule et même entité antigénique.

Quoiqu'il en soit, les deux diagrammes immunoélectrophorétiques proposés sont en accord pour ce qui est des arcs de précipitation majeurs mais présentent des différences sensibles pour ce qui est des arcs mineurs.

L'immunoélectrophorèse permet donc, à la suite de ces travaux, de caractériser six constituants antigéniques.

2° - PROPRIETES CHIMIQUES

Les travaux sur cette question sont peu nombreux. Ils concernent essentiellement l'analyse élémentaire et la composition en acides aminés : JUKES (1933) (189) KAY et MARSHALL (1938) (190).

Les résultats obtenus par ces auteurs sont repris au Tableau XIV (p. 44).

Par ailleurs, JUKES (1933) (191) a trouvé 4 % d'oses dans les livétines.

Enfin, SEZILLE (1964) (192) a proposé une teneur de 7,5 % d'oses neutres, et une teneur de 1,64 % d'acide sialique.

3° - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE

Les livétines ont été étudiées par chromatographie sur DEAE* - Cellulose, par MANDELES (1960) (193).

La chromatographie est effectuée avec un tampon glyco-colle-phosphate de potassium, à l'aide d'un gradient de concentration et de pH.

Le diagramme d'éluion montre dix fractions mais l'auteur n'a donné aucune précision sur chacune d'elles.

Par ailleurs, RAPPAPORT et LEONIS (1962) (194) ont soumis les protéines

* DEAE - Cellulose : diéthylaminoéthyl - cellulose.

Tableau XIV
Composition Chimique des Livétines
Selon JUKES (1933) (189) - KAY et MARSHALL (1938) (190)

En g / 100 g	Selon	
	<u>JUKES</u> (1933)	<u>KAY et MARSHALL</u> (1938)
Azote	15,5	15,1
Phosphore		0,05
Soufre	1,8	
Acide aspartique	3,0	
Acide glutamique	6,8	
Arginine	5,6	
Histidine	0,93	
Lysine	5,0	
Alanine	6,2	
Cystine / 2	3,5	3,9
Glycocolle		1,8
Isoleucine		
Leucine	10,6	
Méthionine		
Phénylalanine	1,95	
Proline	2,2	
Sérine		
Thréonine		
Tryptophane	1,26	2,1
Tyrosine	3,6	5,2
Valine		



solubles du jaune d'oeuf au fractionnement chromatographique sur Carboxy-méthyl-cellulose, gel de dextrane, Amberlite IRC 50 et DEAE** - Sephadex. Les auteurs ont donné les diagrammes d'éluion obtenus, mais n'ont pas étudié les nombreuses fractions auxquelles ces chromatographies permettent d'aboutir, montrant, selon eux la complexité du mélange étudié.

C - LES CONSTITUANTS α , β ET γ LIVÉTINES

Différents auteurs ont établi les proportions relatives des constituants α , β et γ livétines dans le mélange obtenu à partir du jaune d'oeuf. Les résultats sont assez discordants et figurent au Tableau XV (p. 46).

1° - PREPARATION

Différentes méthodes permettent d'obtenir la livétine γ .

- SHEPPARD et HOTTLE (1949) (199) ont obtenu ce constituant à 95 % de pureté par précipitation à l'alcool éthylique à 18 %.

- MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (200), ont décrit deux méthodes de préparation de la γ livétine par précipitation, soit avec du sulfate d'ammonium à 37 % de saturation, à 4° C, soit avec de l'alcool isopropylique à 20 % et à 0° C.

Toutefois, la livétine γ qu'ils ont obtenue n'est pas pure, mais souillée des autres constituants. De plus, ils ont signalé qu'il s'agit d'un composé instable cette instabilité se traduisant par une perte de solubilité au cours des étapes de purification et lors de la lyophilisation.

- MARTIN et COOK (1958) (201), ont réussi à purifier la livétine γ par précipitations successives à 34 % de saturation en sulfate d'ammonium.

Après élimination de la livétine γ , des essais de préparation de chacune des livétines α et β , ont été décrits à partir du mélange de ces deux composés.

- En 1955, GORINI et LANZAVECCHIA (202) ont publié un procédé de fractionnement des livétines au sulfate d'ammonium.

** DEAE - Sephadex : diéthylaminoéthyl - Sephadex.

Tableau XV
Proportions Relatives des Constituants α , β et γ dans les Livétines

En % des Livétines	<u>SHEPPARD et HOTTLE</u> (1949) (195)	<u>GORINI et</u> <u>LANZAVECCHIA</u> (1955) (196)	<u>BERNARDI</u> (1960) (197) <u>COOK</u> (1962) (198)	
			En % des Livétines	En % des Solides du Jaune
α	17,3	18,7 (F3)	20,5	2,2
β	32,7	44,1 (F2)	50	5,3
γ	50,0 (1)	32,4 (F1) 4,8 (F2) bis	29,5	3,1

Les fractions F_1 et F_2 , correspondant respectivement aux livétines γ et β se révèlent homogènes en électrophorèse libre. Le schéma de ce procédé est donné à la figure 7 (p. 48).

- Selon MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (203), il n'est pas possible d'isoler les livétines α et β , par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. En effet, à demi saturation, 83 % des protéines en solution précipitent. Il s'agit alors d'un mélange des livétines α et β . Précipitable par le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation, ces auteurs ont attribué à la livétine α les caractères d'une pseudo-globuline.

- WILLIAMS (1962) (204), a obtenu des résultats différents et selon lui, une faible partie seulement de l' α livétine précipite à 50 % de saturation, en sulfate d'ammonium, la majeure partie précipitant à une concentration supérieure et la livétine α ayant alors le comportement d'une albumine.

- La méthode adoptée par MARTIN et Coll (1957) (205), pour préparer les α et β livétines est l'électrophorèse préparative. Ces auteurs ont ainsi isolé de petites quantités de chacun des constituants afin de les étudier.

- Un procédé semblable a été utilisé par WILLIAMS (1962) (206), qui a signalé que la livétine β , en solution à 0,5 %, n'est pas précipitée par l'acide perchlorique 0,6 M, ni par chauffage au bain-marie bouillant, mais, par contre, l'est par l'acide sulfosalicylique 0,2 M et par l'acide trichloracétique à 5 %.

2° - COMPOSITION CHIMIQUE ET CARACTERISTIQUES

Ces différents points font l'objet de travaux parmi lesquels ceux de :

- MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (207),
- MARTIN et COOK (1958) (208),
- COOK (1961) (209),
- COOK (1962) (210),
- WILLIAMS (1962) (211).

Les résultats obtenus par les auteurs sont rassemblés au Tableau XVI (p. 49).

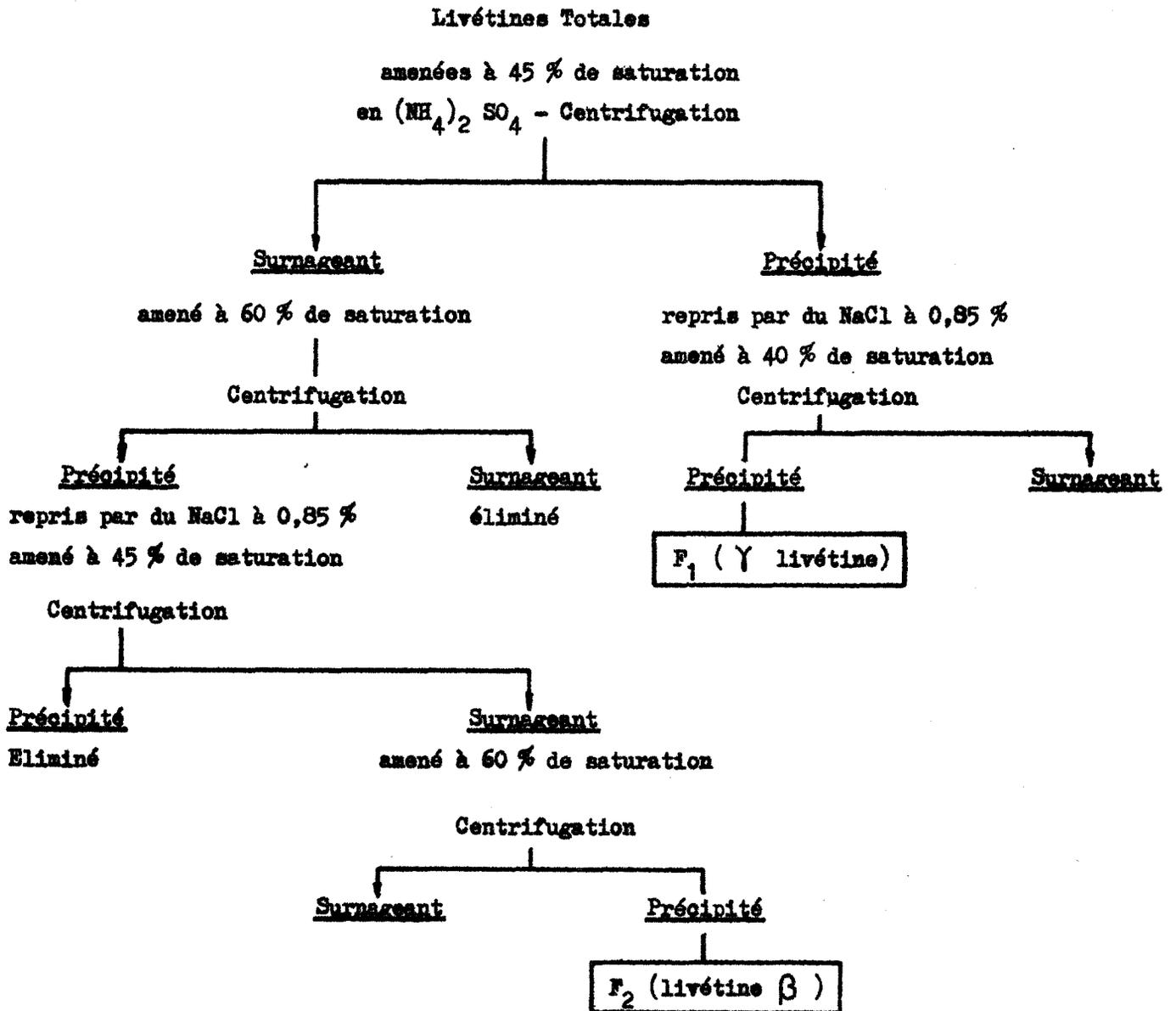


Figure 7

Schéma de Fractionnement des Livétines au Sulfate d'Ammonium
GORINI et LANZAVECCHIA (1955) (202)

Tableau XVI
Caractéristiques des α , β et γ Livétines

% du constituant	Livétine α	Livétine β	Livétine γ
Azote (1) (2) (4)	14,3	14,3	15,6
Phosphore (4)	0,1	0,1	0,03
Poids moléculaire (4)	80 000	42 000	150 000
Acides Aminés N-Terminaux (3)	Arg. : Lys.	Lys + 2 autres	Ala
Rapport molaire Tyr/Try (1) (2)	6,4	2,4	1,6
Composition en glucides (1) (2)			
- Oses	-	7	2,6
- Hexosamines	-	(5) 3,7	1,8
- Acides Sialiques	-	(5) 0,8	-

- (1) - MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (207),
 (2) - MARTIN et COOK (1958) (208),
 (3) - COOK (1961) (209),
 (4) - COOK (1962) (210),
 (5) - WILLIAMS (1962) (211).



D - LIVETINES ET PROTEINES SERIQUES DE LA POULE

On sait depuis la fin du siècle dernier que les anticorps de la poule se retrouvent au niveau du jeune poulet et de l'embryon, afin de les immuniser.

Différents anticorps ont été étudiés de ce point de vue, parmi lesquels : L'anticorps anti-tétanique, par KLEMPERER (1893) (212), puis RAMON (1928) (213), (214), l'anticorps anti-diphthérique, par DZIERZGOWSKI (1901) (215), puis JUKES et Coll (1934) (216).

Ce fait général semble prouver le passage de protéines du sérum de la poule vers l'oeuf, tout d'abord, pour se retrouver au niveau du sérum embryonnaire.

Dès 1932, JUKES et KAY (217) ont signalé la présence d'au moins deux protéines du sérum dans le jaune d'oeuf. Ce fait a été confirmé par ROEPKE et BUSHNEL (1936) (218) et rejoint les travaux faits à propos des lipoprotéines. (voir chapitre 1 : p. 34).

SCHECHTMAN (1947) (219) a pensé que les livétines sont des constituants importants et peut être les seuls dans le sérum de l'embryon au cours des premiers jours de l'incubation.

Puis en 1949, SHEPPARD et HOTTLE (220) ont remarqué que la livétine est semblable à l'albumine sérique de la poule, pour ce qui est de la constante de sédimentation, du poids moléculaire et de la mobilité électrophorétique.

Reprenant les recherches des auteurs précédents, MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (221) ont pensé qu'il s'agit en fait de deux constituants distincts, bien que leurs rapports Tyr/Try soient identiques.

Les travaux de NACE (1953) (222) ont précisé les conclusions de SCHECHTMAN : selon NACE, les livétines contiennent des constituants homologues de chaque protéine présente chez la poule. Par ailleurs, les protéines du jaune, issues de l'organisme maternel, constituent une source de protéines sériques disponibles pour l'embryon jusqu'à ce qu'il synthétise ses propres constituants, synthèse dans laquelle elles servent de modèles.

KNIGHT et SCHECHTMAN (1954) (223) ont injecté par voie intraveineuse, à des poules en période de ponte, de la sérumalbumine et des γ globulines bovines.

Ils retrouvent ces constituants dans les oeufs pondus au cours des deux semaines qui suivent l'injection. Ils ont démontré ainsi le transfert possible du sérum vers l'oeuf, des anticorps d'une part (γ globulines), d'un constituant protéique dépourvu de cette activité d'autre part (sérumalbumine).

Ces résultats sont confirmés par PATTERSON (1961) (224).

WILLIAMS (1962) (225), a repris ces travaux et, utilisant l'immuno-électrophorèse, a montré que, l' α livétine a le même comportement antigénique que la serumalbumine de la poule. Cet auteur, après avoir isolé les deux constituants, a comparé également leur comportement électrophorétique en gel d'amidon. Enfin, il a soumis les deux protéines à une hydrolyse par la trypsine dans les mêmes conditions et étudié les électro-chromatogrammes des peptides obtenus qui présentent des images très voisines.

Il a donc été amené à conclure que la livétine α est en fait identique à la serumalbumine.

Ce même auteur, poursuivant son étude, a comparé aussi les autres livétines aux protéines sériques. Tout d'abord, il a étudié les images obtenues en électrophorèse en gel d'amidon. Ensuite, faisant réagir en immuno-électrophorèse, le sérum de poule contre un immun-sérum anti-livétines totales, il a obtenu un certain nombre d'arcs de précipitation (Figure 8, p. 52).

Il en déduit que :

- La livétine β peut être identifiée à une α_2 glycoprotéine sérique.
- La livétine γ donne la même réaction antigénique que les γ globulines sériques de la poule.

CHI CHING MOK et COMMON (1964) (226) (227) ont fait une étude immuno-électrophorétique analogue. Ils ont obtenu, dans les mêmes conditions, le diagramme de la Figure 9, (p. 53), et à l'aide d'immuno-électrophorèses à fente partielle, selon la technique de CLAUSEN et HEREMANS (1960) (228), ont montré, par raccordement, l'identité des arcs 1 et a, 3 et d, 5 et h.

Leurs conclusions rejoignent donc celles de WILLIAMS. L'identification antigénique de la serumalbumine et de la livétine α d'une part, d'une α_2 globuline et de la livétine β d'autre part, et enfin des γ globulines et de la livétine γ est possible.

En outre, ils ont obtenu le raccordement des arcs 4 et f mettant ainsi en évidence un quatrième composé antigéniquement commun aux livétines et au sérum. L'arc 4 est celui de la livétine γ_1 , auquel correspond la transferrine dans le diagramme obtenu par WILLIAMS. Ce composé est étudié plus loin. (p. 77).

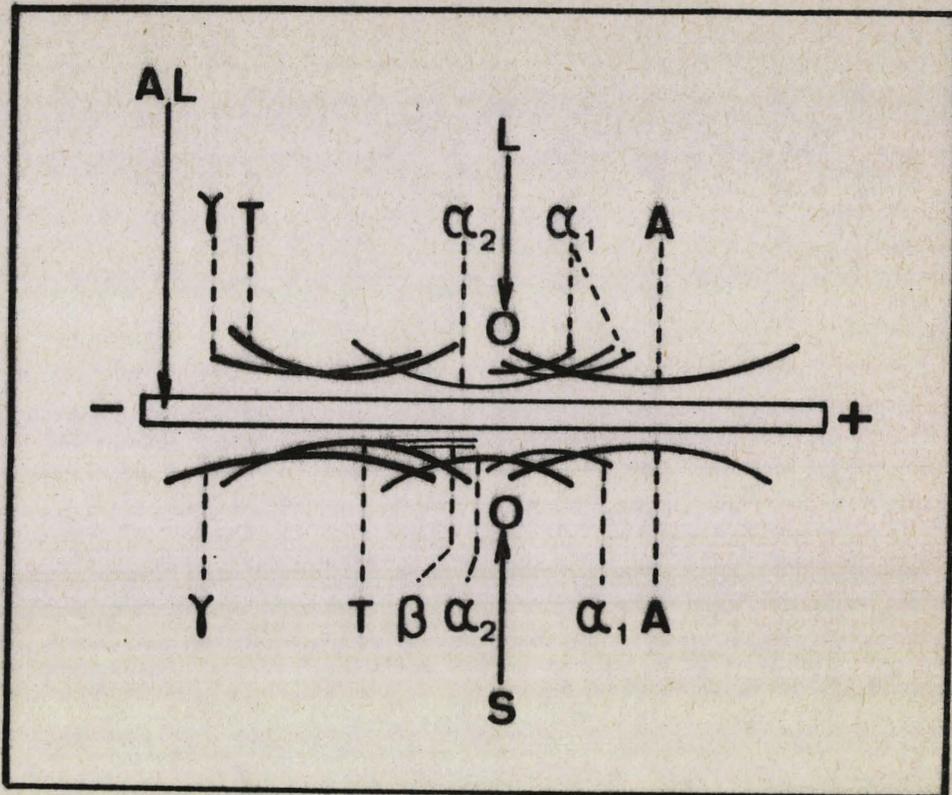


Figure 8

Identité Antigénique des Livétines et des Protéines sériques de la Poule
Selon WILLIAMS (1962) (225)

- A : Albumine
- α_1 : α_1 globuline
- α_2 : α_2 globuline
- β : β globuline
- T : Transferrine
- γ : γ globuline
- L : Livétines
- S : Sérum de poule
- AL: Sérum anti-livétines.



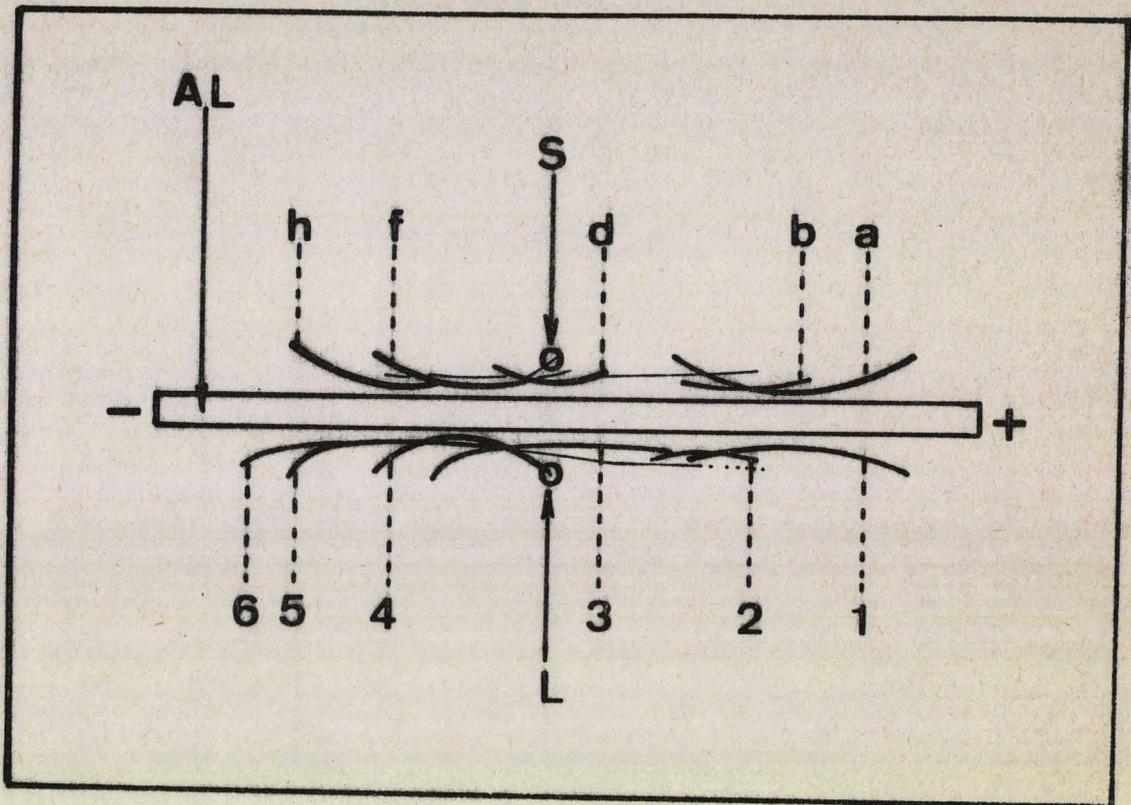


Figure 9

Identité Antigénique des Livétines et des Protéines sériques de la Poule
Selon CHI CHING MOK et COMMON (1964) (226) (227)

a : Sérum Albumine	1 : Livétine α
d : α_2 glycoprotéine	3 : Livétine β
f : Transferrine	4 : Livétine γ_1
g : γ globuline	5 : Livétine γ_2
S : Sérum de poule	L : Livétines
AL : Sérum anti-livétines.	

II - LA PHOSVITINE

Selon WARNER (1954) (229) le jaune d'oeuf contient 0,6 % de phosphore sous forme de phospholipides et de phosphoprotéines. La lipovitelline, en particulier, est riche en cet élément.

Les premiers, MECHAM et Olcott (1949) (230) ont isolé du jaune d'oeuf une protéine très riche en phosphore (9,7 %) qu'ils ont appelée Phosvitine. Mais la technique de préparation ne permet pas d'obtenir la lipovitelline.

Aussi, certains auteurs ont pensé que la phosvitine pouvait être un produit de dégradation de la lipovitelline, ou une entité protéique formant un complexe avec la lipovitelline. (VANDEGAER, RICHMAN et COOK - 1956) (231).

C'est alors que JOUBERT et COOK (1958) (232) ont proposé une technique de fractionnement du jaune d'oeuf qui permet de préparer la lipovitelline, d'une part, et la phosvitine d'autre part, démontrant qu'il s'agit bien là de deux entités distinctes pouvant s'unir pour former un complexe.

A - PREPARATION

Tout comme pour les livétines, il y a lieu d'envisager deux types de techniques de préparation :

1° - LES METHODES GENERALES DE PREPARATION

Les procédés généraux de fractionnement du jaune d'oeuf proposés par BERNARDI et COOK (1960) (233), (Figure 1, p. 16) et COOK (1962) (234) (Figure 2, p. 17), permettent en outre de préparer la phosvitine.

2° - LES METHODES PARTICULIERES DE PREPARATION

a) Les méthodes par précipitation

Dès 1948, MECHAM et OLCOTT (235) ont mis au point un procédé de préparation de la phosvitine. Ce procédé a été repris par les mêmes auteurs en 1949 (236), il est schématisé à la Figure 10 (p. 55).

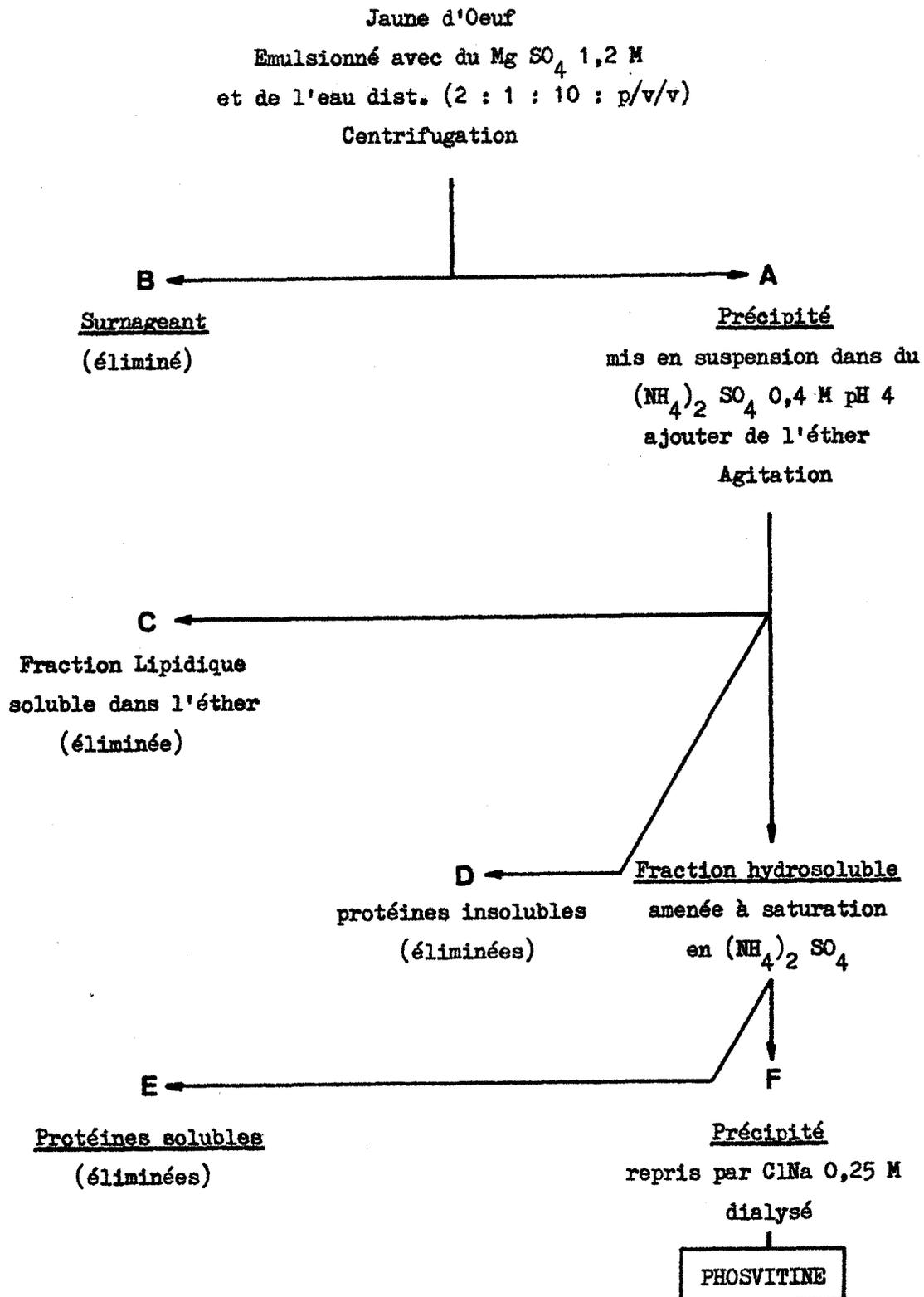


Figure 10

Préparation de la Phosvitine

Selon MECHAM et OLCOTT (1949) (235) (236)

SUGANO (1958) (237), JOUBERT et COOK (1958) (238), ont décrit des procédés de fractionnement du jaune d'oeuf, en vue de préparer la phosvitine, procédés voisins de celui de MECHAM et OLCOTT utilisant également des précipitations fractionnées par le sulfate de magnésium.

Un procédé différent de préparation a été décrit par SUNDARARAJAN et Coll (1960) (239). Ces auteurs ont précipité le complexe lipovitelline-phosvitine par dilution du jaune d'oeuf avec deux volumes d'eau distillée. Le précipité est séparé du surnageant par centrifugation et redissous dans une solution aqueuse de NaCl à 10 %. Puis selon la technique décrite par MORTON et Coll (1955) (240) la solution est extraite à l'aide du butanol, puis à l'éther. Enfin, la phosvitine est précipitée de la phase aqueuse résiduelle par le sulfate de magnésium. Le précipité est récupéré, dialysé et lyophilisé.

Mc INDOE (1961) (241) a modifié ce procédé de préparation de la phosvitine et préconisé de dissoudre le précipité de lipovitelline-phosvitine dans une solution de citrate trisodique 0,1 M. La solution est ensuite extraite au butanol et à l'éther afin d'éliminer la lipovitelline.

b) Les méthodes chromatographiques

RADOMSKI et COOK (1964) (242), ont proposé un procédé de fractionnement du jaune d'oeuf sur colonne de DOWEX I, permettant d'obtenir, à l'aide d'un gradient linéaire de concentration en acétate de sodium, la phosvitine d'une part, la fraction lipovitellénique d'autre part.

Ces mêmes auteurs, (1964) (243), ont utilisé par ailleurs, la chromatographie sur TEAE* - Cellulose en gradient de force ionique pour séparer les α et β lipovitellines ainsi que la phosvitine. Ce procédé chromatographique leur a permis de mettre en évidence un autre constituant qui est identifié à un complexe lipovitelline-phosvitine.

B - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

1° - PROPRIETES PHYSIQUES

a) Masse moléculaire

Il ressort des travaux de MECHAM et OLCOTT (1949) (244), que la phosvitine est homogène en ultracentrifugation.

* TEAE - Cellulose : Triéthylaminoéthyl-cellulose.

Cette donnée a été confirmée par JOUBERT et COOK (1958) (245) qui ont conduit une étude dans différents tampons.

Les travaux réalisés à l'aide de cette technique ont amené les auteurs à déterminer la masse moléculaire de la phosvitine.

Selon le tampon employé pour faire les mesures, MECHAM et OLCOTT (1949) (246), ont obtenu des valeurs comprises entre 12.000 et 39.000.

Basée sur la pression osmotique, la méthode de BULL (1946) (247), employée par ces mêmes auteurs, les a conduit à des valeurs comprises entre 21.000 et 38.000.

Ces résultats ont amené les auteurs à conclure qu'en présence d'ions métalliques, en particulier d'ions magnésium, la formation de complexes moléculaires est possible, à partir du monomère de base.

JOUBERT et COOK (1958) (248), ont obtenu par ultracentrifugation dans différents systèmes tampons, des valeurs de cette même masse moléculaire comprises entre 26.900 et 30.400.

Rectifiant ce résultat, COOK (1961) (249) a proposé celle de 36.000.

b) Comportement électrophorétique

1. L'électrophorèse libre

Utilisant l'électrophorèse libre, MECHAM et OLCOTT (1949) (250), d'une part, BERNARDI et COOK (1960) (251), d'autre part, ont montré que ce composé est hétérogène puisqu'il donne de 1 à trois pics selon le tampon utilisé. Par ailleurs, le comportement électrophorétique est différent selon que l'observation est faite dans la branche ascendante ou descendante de la cuve.

Cette particularité est due, semble-t-il, aux réactions de pontage possibles entre deux groupements phosphates de deux molécules voisines de phosvitine et un cation divalent (Ca^{++} ou Mg^{++}) présent dans le tampon.

Quoiqu'il en soit, la mobilité électrophorétique de la phosvitine est élevée : selon MECHAM et OLCOTT (1949)(252), elle est comprise entre -9 et $-12 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ en tampon acétate de sodium de pH 4,6 et de force ionique 0,1.

BERNARDI et COOK (1960) (253) ont obtenu des valeurs comprises entre $-7,4$ et $-12 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, en tampon véronal de pH 9,0 et de force ionique 0,3.

2. L'électrophorèse de zone

Le comportement de la phosvitine en électrophorèse sur papier a été étudié

par Mc CULLY et Coll (1959) (254). Ils ont signalé que la phosvitine est difficile à colorer par l'amidoschwartz, l'azocarmin B et le bleu de bromophénol, ce qui empêche d'intégrer valablement les électrophorogrammes.

Par ailleurs, ils ont confirmé au moyen de cette technique, l'observation faite par JOUBERT et COOK (1958) (255), selon laquelle phosvitine et lipovitelline peuvent s'unir pour former un complexe.

Mc CULLY et Coll ont démontré que la bande correspondant à la phosvitine, en avant de l' α livétine sur les électrophorogrammes obtenus en tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,05, ne correspond pas nécessairement à la totalité de la phosvitine présente dans le jaune d'oeuf, mais seulement à la fraction libérée du complexe lipovitelline - phosvitine au cours de l'électrophorèse.

Le fait d'abandonner 2 à 3 jours à 5° C du jaune d'oeuf dilué avec du NaCl à 1 % augmente la quantité libérée de phosvitine, la bande correspondante sur les électrophorogrammes se trouvant renforcée.

D'autre part, après précipitation de la lipovitelline du jaune, et centrifugation du précipité, l'électrophorogramme réalisé à partir du culot montre une bande correspondant à la phosvitine, ne figurant pas sur celui réalisé à partir du surnageant.

Ces observations permettent donc aux auteurs de conclure que, dans le jaune d'oeuf, la phosvitine forme un complexe avec la lipovitelline.

Enfin, selon les mêmes auteurs, l'analyse électrophorétique sur papier d'une fraction de phosvitine pure permet de mettre en évidence trois bandes au niveau de la zone de migration de ce composé. Cette hétérogénéité comparable à celle obtenue en électrophorèse libre est attribuable au même phénomène.

SUNDARARAJAN et Coll (1960) (256), ont mis en évidence, également, l'hétérogénéité de la phosvitine par électrophorèse sur papier.

Mc CULLY, MOK et COMMON (1962) (257) ont repris l'étude du comportement de la phosvitine en électrophorèse de zone, en utilisant une technique spécifique de révélation des liaisons esters phosphoriques décrite par HARRAP (1960) (258).

SEZILLE (1964) (259) a utilisé deux types de tampon pour étudier la phosvitine : un tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,1 d'une part, et un tampon acide : pyridine, acide acétique, eau de pH 3,9 d'autre part. Dans ce système tampon, la phosvitine migre vers l'anode et reste homogène. Cet auteur a préconisé la coloration au bleu alcian pour mettre en évidence et apprécier quantitativement la phosvitine. Enfin, il a montré qu'en tampon véronal la phosvitine a une vitesse de migration supérieure à celle de la sérum-albumine de poulet, composant, selon lui, le plus rapide du sérum.

c) Comportement chromatographique

L'électrophorèse ayant permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de la phosvitine, différents travaux ont été réalisés, visant à séparer les différentes fractions présentes.

CONNELLY et TABORSKY (1961) (260), ont soumis la phosvitine à l'analyse chromatographique sur colonne de DEAE - Cellulose en tampon tris, l'élution étant conduite à l'aide d'un gradient de concentration en NaCl.

Ainsi, ils ont obtenu deux fractions distinctes ne présentant que des différences de solubilité et de composition en fer et cuivre.

BELITZ (1963) (261), a préconisé l'emploi du DEAE-Sephadex pour fractionner la phosvitine.

Une technique de chromatographie liquide-liquide à contre courant, décrite par MOK, GRANT et TABORSKY (1966) (262), permet d'obtenir deux constituants aux teneurs en azote et phosphore identiques, l'un d'eux étant homogène.

Par ailleurs, les masses moléculaires des constituants ainsi préparés sont différentes (TABORSKY et MOK - 1967) (263).

L'emploi d'une colonne de Sephadex G - 200 a permis à HO et Coll (1969)(264), de purifier la phosvitine, en éliminant une protéine ne contenant pas de phosphore.

Enfin, CLARK (1970) (265), utilisant une colonne de Sephadex G - 100 a préparé, à partir de la phosvitine, deux constituants de nature phosphoprotéique de masses moléculaires, respectivement 34.000 et 28.000 de compositions chimiques également différentes.

2° - PROPRIETES CHIMIQUES

a) Composition

Il résulte des différents travaux effectués en particulier par MECHAM et OLCOTT (1949) (266), SUNDARARAJAN (1960) (267), MOK et Coll (1961) (268), ALLERTON et PERIMAN (1965) (269) et enfin CLARK (1970) (270) que la phosvitine contient :

- De 11,35 à 12,9 % d'azote d'une part,
- De 9,4 à 10,4 % de phosphore d'autre part.

MECHAM et OLCOTT (1949) (271) ont mis en évidence 0.4 % de fer, ainsi que la présence de cuivre, de sodium et de calcium par détermination spectrographique, effectuée sur les cendres du composé.

GREENGARD et Coll (1964) (272) ont confirmé la présence de fer dans la phosvitine. Ces données sont ensuite reprises et précisées par ALLERTON et PERLMAN (1965) (273).

b) Composition de la fraction protéique

La composition en acides aminés de la phosvitine fait l'objet de nombreux travaux parmi lesquels ceux de MECHAM et OLCOTT (1949) (274), LEWIS et Coll (1950) (275) utilisant des méthodes microbiologiques de dosage, ceux de TABORSKY et ALLENDE (1962) (276), BELITZ (1963) (277) et ALLERTON et PERLMAN (1965) (278) les résultats obtenus par ces derniers figurent au Tableau XVII (p. 61).

CLARK (1970) (279) a déterminé la composition en acides aminés des deux constituants qu'il a obtenu par chromatographie de la phosvitine sur Sephadex G - 100 et a mis en évidence des différences appréciables.

La différence essentielle concerne l'acide aminé N - Terminal. Les travaux de NEELIN et COOK (1960) (280), MOK et Coll (1962) (281), BELITZ (1966) (282) ont montré que l'on rencontre, à côté de l'alanine, principal acide-aminé N - Terminal la lysine.

Selon CLARK (1970) (283) l'un des constituants isolés, le constituant majeur a pour acide aminé N - Terminal : l'alanine, l'autre ayant : la lysine.

MECHAM et OLCOTT (1949) (284) a observé que la molécule de phosvitine contient des nombres comparables de résidus séril et phosphoryl et a pensé que le phosphore est présent dans la molécule sous forme d'acide séril-phosphorique.

ALLERTON et PERLMAN (1965) (285) ont repris ce travail, démontré la présence de phosphosérine, mais signalé également celle d'au moins un résidu de phosphothréonine par molécule de phosvitine.

c) Composition de la fraction glycanique

MECHAM et OLCOTT (1949) (286) ont souligné l'absence de pentoses dans la phosvitine.

Par contre, TUNMAN et SILBERZAHN (1962) (287) ont mis en évidence la nature glycoprotéinique de la phosvitine en dosant la glucosamine, présente.

Tableau XVII
Composition en Acides Aminés de la Phosvitine
Selon ALLERTON et PERLMAN (1965) (278)

Nature des Acides Aminés	g/100 g de Protéides
Acide Aspartique	4,51
Acide Glutamique	4,71
Arginine	5,00
Histidine	4,00
Lysine	5,98
Alanine	1,56
Cystine / 2	0
Glycocolle	0,88
Isoleucine	0,53
Leucine	0,76
Méthionine	0,28
Phénylalanine	0,76
Proline	1,87
Sérine	30,9
Thréonine	1,36
Tryptophane	0,41
Tyrosine	0,39
Valine	0,90
Glucosamine	1,43
Hexose	2,5
PO ₃	26,8
Sodium	3,2
Fer	0,29
Cuivre	0,07

BUS
LILLE

Ce fait est confirmé par ALLERTON et PERLMAN (1965) (288) qui ont donné les teneurs de 2.5 % d'hexose et de 1.45 % de glucosamine dans la phosvitine.

d) Structure

Les mesures physiques conduites par JOUBERT et COOK (1958) (289) d'une part, GRIZZUTI et PERLMAN (1970) (290) d'autre part, ont permis à ces auteurs de proposer pour la phosvitine, une molécule de forme allongée, dans laquelle les charges électriques négatives des groupements phosphoryl se repoussent les unes les autres conférant par ailleurs à ce composé les propriétés générales d'un polvélectrolyte.

BELITZ (1964) (1965) (1966) (291) (292) (293) a étudié la séquence des aminoacides dans la phosvitine afin d'en établir la structure complète.

C - ROLE

Selon MECHAM et OLCOTT (1949) (294), la teneur en phosvitine du jaune d'oeuf est de 1 %. Différents rôles ont été attribués à ce composé.

1. Transport du fer

AHMED et Coll (1963) (295) et GREENGARD et Coll (1964) (296) ont pensé que le fer se trouve dans le jaune d'oeuf principalement sous forme de complexe avec la phosvitine.

2. Transport du groupement phosphate

CHARGAFF (1942) (297) a injecté à une poule une solution de phosphate de sodium contenant du phosphore radioactif et constaté que celui-ci est rapidement incorporé dans la fraction vitellénique à laquelle appartient la phosvitine.

Par la suite, le phosphore radioactif est décelable au niveau des phosphatides du jaune. On peut donc penser que les acides aminés phosphorylés de la phosvitine interviennent dans la biosynthèse des phosphatides.

3. Stockage de l'énergie

Dès 1960, RABINOWITZ et LIPMAN (298) ont signalé que la phosvitine joue un rôle dans le métabolisme énergétique de l'embryon.

GRANT et TABORSKY (1966) (299), puis ROSENSTEIN et TABORSKY (1970) (300) ont étudié le mécanisme de déphosphorylation oxydative de la phosvitine. Leurs travaux les ont amené à conclure que ce composé peut être un modèle macromoléculaire de stockage de l'énergie nécessaire au développement de l'embryon.

D - PHOSVITINE ET PROTEINES SERIQUES DE LA POULE

Utilisant l'ultracentrifugation, SCHJEIDE et URIST (1956) (1958) (1959) (301) (302) (303) ont isolé du sérum de la poule une phosphoprotéine riche en sérine.

MC CULLY, MAW et COMMON (1959) (304), MC CULLY et COMMON (1961) (305) ont réussi à mettre en évidence un constituant, ayant le comportement de la phosvitine dans le sérum de poule traitée aux hormones oestrogènes.

Pour cela, ils ont extrait les lipoprotéines du sérum et, après traitement par l'oxalate, ayant pour but de précipiter le calcium, ils ont soumis la solution à l'électrophorèse de zone sur papier.

Après coloration, l'électrophorégramme révèle une zone de lipoprotéine et une zone correspondant à un composé ayant le comportement de la phosvitine du jaune d'oeuf.

L'électrophorèse du sérum tel quel ne permet pas de mettre en évidence ce même constituant.

COMMON et MOK (1959) (306), MOK, MARTIN et COMMON (1961) (307) ont isolé du sérum de la poule en période de ponte, traitée aux hormones oestrogènes, une phosphoprotéine tout à fait comparable, par ses propriétés, à la phosvitine isolée du jaune d'oeuf.

HEALD (1962) (308) a montré qu'il est possible d'isoler la phosphorylsérine des phosphoprotéines sériques de la poule en période de ponte mais n'a pas réussi à isoler la phosvitine, à partir du sérum, par les procédés décrits à propos du jaune d'oeuf.

En 1963, cet auteur (309) a proposé un procédé original de préparation d'une phosvitine à partir du plasma de la poule en période de ponte, non traitée aux hormones oestrogènes. Il a étudié le composé et lui trouve des propriétés très voisines de celles décrites pour la phosvitine du jaune.

Il en a conclu qu'il s'agit du même constituant, complexé différemment dans le jaune et dans le sérum.

III - LA RIBOFLAVOPROTEINE

En 1962, OSTROWSKI et Coll (310) ont mis en évidence dans le jaune d'oeuf un complexe protéique de la riboflavine : la riboflavoprotéine.

BLUM (1966) (311) a repris le fractionnement du jaune d'oeuf décrit par BERNARDI et COOK (1960) (312) et dosé la riboflavine dans les différentes fractions ainsi préparées. Il a démontré que les lipoprotéines sont dépourvues ou renferment très peu de riboflavine. Selon lui, la vitamine B₂ se trouve presque exclusivement dans les protéines solubles et la richesse de la fraction la plus mobile en électrophorèse l'amène à supposer l'existence d'une "flavoprotéine" correspondant à l'entité isolée par OSTROWSKI et Coll (1962) (313).

A - PREPARATION

1° - PREPARATION DE LA RIBOFLAVOPROTEINE

Le premier procédé de préparation décrit par les auteurs comporte les étapes suivantes :

- . le jaune d'oeuf est homogénéisé avec trois volumes de ClNa à 0,85 % et le mélange est extrait à l'éther.
- . la phase aqueuse obtenue est amenée à 55 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu est éliminé.
- . La solution est amenée à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité formé est récupéré, dissous dans un faible volume d'eau et extrait au phénol.
- . La couche phénolique est alors extraite à l'eau en présence d'éther. La phase aqueuse contient la riboflavoprotéine.
- . La fraction ainsi obtenue est soumise à l'électrophorèse préparative en gel d'amidon, conduisant à la riboflavoprotéine.
- . Ce composé n'est pas obtenu pur. La purification est faite par chromatographie d'échange d'ion sur DEAE - Cellulose en gradient de pH et de force ionique.

La même équipe de chercheurs (ZAK et OSTROWSKI - 1963) (314) a modifié ce procédé de préparation de la façon suivante :

- . Le précipité obtenu à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium est dissous dans l'eau et dialysé contre un tampon phosphate 0,05 M , pH 5,9.

- . La solution obtenue est soumise à un fractionnement chromatographique sur DEAE - Cellulose, stabilisée dans ce même tampon phosphate 0,05 M de pH 5,9.
- . L'élution est faite en gradient discontinu de pH et de concentration.
- . Cette chromatographie conduit à une fraction contenant 60 % de riboflavoprotéine.
- . La purification est réalisée sur colonne de DEAE - Cellulose à l'aide d'un gradient continu linéaire de pH et de force ionique.

Le second procédé permet de préparer 200 mg de riboflavoprotéine purifiée à partir de 100 oeufs.

2° - PREPARATION DE L'AOPROTEINE

Afin d'étudier la riboflavoprotéine, les auteurs ont cherché à séparer le composé protéique ou apoprotéine du groupement prosthétique : la riboflavine.

Dans le procédé décrit par OSTROWSKI et Coll (1962) (315) la riboflavine est éliminée du complexe à pH 2 en présence de sulfate d'ammonium, extraite par le phénol et enfin identifiée par chromatographie sur papier.

ZAK et OSTROWSKI (1963) (316) ont signalé que la liaison riboflavine protéine est rompue à pH 3 mais qu'il n'est pas possible d'éliminer la vitamine B₂ par dialyse du fait de l'existence d'un équilibre entre le complexe et ses éléments.

Les auteurs ont proposé un procédé de préparation de l'apoprotéine par chromatographie sur gel de Sephadex G 25 équilibré en tampon citrate de sodium 0,1 M de pH 3, à 3° C. L'apoprotéine, exclue, est éluee en tête. La riboflavine peut ainsi être facilement récupérée, dosée et étudiée.

B - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

1° - PROPRIETES PHYSIQUES

a) Masse moléculaire

Les études préliminaires réalisées par OSTROWSKI et Coll (1962) (317) conduisent les auteurs à proposer, pour la riboflavoprotéine, une masse moléculaire de 40.000. Par ailleurs, le composé étudié se révèle homogène à l'ultracentrifugation.

ZAK et OSTROWSKI (1963) (318), OSTROWSKI et Coll (1968) (319) se basant, d'une part sur les résultats obtenus à l'aide de l'ultracentrifugation, et d'autre

part sur la connaissance de la composition en riboflavine ont obtenu la valeur de 36.000.

Ces résultats sont rassemblés au Tableau XVIII (p. 67).

b) Comportement électrophorétique

1. Electrophorèse libre

ZAK et Coll (1968) (320) ont étudié la riboflavoprotéine qu'ils ont préparée en électrophorèse libre. Pour cela, ils ont utilisé un tampon phosphate 0,05 M de pH 7,2. Dans ces conditions, le composé est homogène, sa mobilité est de $4,467 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$.

Reprenant cette étude, OSTROWSKI et Coll (1968) (321) ont employé différents tampons, de pH compris entre 5,2 et 8,6. Dans ces conditions, la riboflavoprotéine reste homogène et migre vers l'anode.

Les auteurs suivent les variations de mobilité du constituant en fonction du pH et déterminent de cette manière le point isoélectrique dont la valeur est comprise entre 4,1 et 4,2.

2. L'électrophorèse de zone

L'électrophorèse de zone a été employée pour étudier la riboflavoprotéine : OSTROWSKI et Coll (1962) (322) ont utilisé l'électrophorèse sur papier en tampon véronal 0,05 M de pH 8,5. Dans ces conditions, la riboflavoprotéine est homogène et migre vers l'anode.

ZAK et OSTROWSKI (1963) (323) ont soumis la riboflavoprotéine à l'électrophorèse en gel d'amidon. Ils ont utilisé différents systèmes tampons dont les pH sont compris entre 4,0 et 8,6. Dans tous les cas, la riboflavoprotéine migre vers l'anode.

Par ailleurs, les auteurs ont signalé que l'apoprotéine possède la même mobilité électrophorétique que la riboflavoprotéine saturée en riboflavine.

BLUM (1966) (324) a opéré un échange de la riboflavine contenu dans le jaune par une riboflavine radioactive. Après incorporation, les protéines solubles du jaune sont extraites et soumises à l'électrophorèse sur papier.

La révélation est faite d'une part à l'aide d'un colorant des protéines, par auto-radiographie, d'autre part. L'auteur a montré ainsi que la riboflavoprotéine migre en avant de l' α livétine. Le tampon utilisé est un tampon tris de pH 8,9.

Tableau XVIII
Masse Moléculaire de la Riboflavoprotéine du Jaune d'Oeuf
Selon OSTROWSKI et Coll (1968) (319)

Constante de Sédimentation S°_{20w}	3,16
Constante de Diffusion D°_{20w}	7,45
Volume Spécifique Partiel	0,699
<u>Masse moléculaire</u>	
- Méthode de Svedberg	36 000
- Teneur en riboflavine	36 000



ZAK, WEBER et OSTROWSKI (1968) (325) ont employé deux supports pour étudier la riboflavoprotéine. Le gel de polyacrylamide en disque d'une part en tampon tris-glycocolle 0,025 M de pH 8,3 l'acétate de cellulose d'autre part, en tampon tris-phosphate de sodium, acide citrique de pH 8,4. Dans ces deux cas, riboflavoprotéine et apodérivé sont homogènes et présentent des mobilités électrophorétiques semblables.

L'élimination du groupement prosthétique ne modifie donc pas selon les auteurs, le comportement électrophorétique et la structure moléculaire du composé.

c) Propriétés optiques

ZAK et OSTROWSKI (1963) (326) ont étudié les propriétés optiques de la riboflavoprotéine et de l'apoprotéine. Ils ont donné, en particulier, les spectres obtenus en lumière visible, ultra-violette et infra-rouge. Les résultats obtenus sont rassemblés au Tableau XIX (p. 69). En lumière visible, le spectre de la riboflavoprotéine présente deux maxima d'absorption : l'un à 375 nm. l'autre à 458 nm. La riboflavine libre présente un spectre analogue, en lumière visible, avec deux maxima : l'un à 373 nm. l'autre à 445 nm. Cette légère différence a été utilisée par ZAK et Coll (1968) (327) pour suivre la saturation de la riboflavoprotéine, en riboflavine.

Par ailleurs, selon ZAK et OSTROWSKI (1963) (328) les solutions de riboflavoprotéine de pH compris entre 4,0 et 8,5 ne donnent pas de fluorescence en lumière ultra-violette. propriété que possède la riboflavine libre.

Les résultats obtenus, comparés à ceux que fournissent d'autres méthodes (spectrophotométriques, microbiologiques de dosage de la riboflavine, polarographiques) montrent que la saturation est obtenue lorsque chaque molécule d'apoprotéine a fixé une molécule de riboflavine.

L'examen des données acquises par mesure de la fluorescence permet d'établir que la riboflavoprotéine est en équilibre avec la riboflavine et l'apoprotéine. La constante de dissociation du complexe, mesurée à pH 7 et à 23,5° C est de $2,65 \cdot 10^{-9}$ M. Cela indique que la riboflavine est fortement liée à la protéine (OSTROWSKI et KRAWCZYK - 1963) (329).

2° - PROPRIETES CHIMIQUES

a) Analyse élémentaire

Dès 1962, OSTROWSKI et Coll (330) ont proposé pour la riboflavoprotéine les teneurs suivantes en azote et en phosphore :

Tableau XIX

Propriétés Optiques de la Riboflavoprotéine et de l'Apoptéine

Selon ZAK et OSTROWSKI (1963) (326)

Composé	<u>Lumière Visible</u> Longueur d'onde (nm) au Max.	<u>U. V.</u> Longueur d'onde (nm) au Max.	<u>I. R.</u> Fréquence (cm ⁻¹) au Max.
Riboflavoprotéine	375 - 458	276	<u>1050*</u> , 1110, <u>1170</u> , 1390** 1450, <u>1460</u> , <u>1540*</u> , <u>1670*</u> .
Apoflavoprotéine	-	280	1050, 1110, 1390, 1450, 1540, 1670.

* - Ces pics sont plus marqués dans le cas de la riboflavoprotéine -

** - Ce pic est plus faible dans le cas de la riboflavoprotéine -



- Azote : 13,- %
- Phosphore : 0,2 %

Ces valeurs ont été confirmées par ZAK et OSTROWSKI (1963) (331), OSTROWSKI et Coll (1968) (332).

b) Composition de la fraction glycoannique

ZAK et OSTROWSKI (1963) (333) ont signalé la présence de 8 % d'hexoses dans la riboflavoprotéine. Selon ces auteurs, la riboflavoprotéine ne contient ni osamine ni pentose, ni cétose, mais seulement du galactose à raison de 16 résidus par molécule de protéine.

Cette étude a été reprise par OSTROWSKI, ZAK et KRAWCZYK (1968) (334) qui ont obtenu des résultats différents que nous avons rassemblés dans le Tableau XX (p. 71).

Les hydrolyses sont conduites à l'aide d'acide sulfurique normal ou deux fois normal, à 100° C pendant 10 heures.

Après neutralisation par Ba (OH)₂ ou passage sur colonne de Sephadex G 25 la solution est étudiée par chromatographie sur papier dans le système solvant : N - Butanol - Pyridine - Eau (5 : 3 : 2 : v/v/v/), ou par chromatographie sur colonne de DOWEX 2 x 8, selon la méthode de WALBORG et Coll (1965) (335).

Les auteurs ont souligné qu'il est possible, après hydrolyse acide ou enzymatique par la neuraminidase, de mettre en évidence, entre 0,32 et 0,50 mole d'acide sialique par mole de riboflavoprotéine. Selon eux, l'acide sialique ne fait pas partie intégrante de la molécule mais provient d'une glycoprotéine qui souille leurs préparations de riboflavoprotéine.

Cette déduction s'appuie également sur les résultats obtenus par WEBER et Coll (1966) (336) selon lesquels le traitement de la flavoprotéine par la neuraminidase ne modifie en rien le comportement électrophorétique ni la capacité de réaction immunologique du composé.

L'oxydation périodique réalisée par OSTROWSKI et Coll (1968) (337) sur la riboflavoprotéine montre qu'elle a lieu en deux temps :

- Une première phase d'oxydation rapide,
- Suivie d'une seconde phase au cours de laquelle l'oxydation est plus lente.

L'extrapolation du résultat montre que 12 moles de NaIO₄ sont nécessaires à oxyder tous les sucres présents dans un mole de riboflavoprotéine. Cela correspond à une comule glucidique linéaire ne possédant qu'une ramification.

Tableau XX
Composition en Glucides de la Riboflavoprotéine du Jaune d'Oeuf
Selon OSTROWSKI et Coll (1968) (334)

Glucides	Composition Centésimale g/100 g de protéine	Composition Molaire	
		g/mole*	Nombre de Résidus/mole*
<u>Composition Globale</u>			
Glucides Totaux	11,78	3.445	21,4
Oses Neutres	7,79	2.370	15,4
Osamines	3,99	1.075	6,0
<u>Composition en Sucres</u>			
Galactose	2,65	919	5,1
Glucose	1,61	576	3,2
Mannose	2,95	1.063	5,9
Fucose	0,58	197	1,2
Glucosamine	3,99	1.075	6,0

* Pour une masse moléculaire de 36.000.



c) Composition de la fraction protidique

1. La composition en acides aminés a été étudiée par ZAK et OSTROWSKI (1963) (338).

Des résultats plus complets, figurant au Tableau XXI (p. 73) ont été proposés par OSTROWSKI, ZAK et KRAWCZYK (1968) (339).

L'analyse est conduite selon la technique de SPACKMAN, STEIN et MOORE (1958) (340). La cystine est dosée selon la méthode décrite par KIRS (1956) (341), le tryptophane est déterminé par colorimétrie à l'aide de la méthode de SPIES et CHAMBERS (1948) (342).

2. Les acides aminés N et C Terminaux ont été proposés par ZAK et OSTROWSKI (1963) (343).

La méthode au 1 - fluoro - 2,4 - dinitrobenzène de SANGER et THOMPSON (1953) (344) appliquée à la riboflavoprotéine permet de caractériser un seul DNP - dérivé : le DNP - arginine.

L'hydrazinolyse, selon la méthode décrite par BURGI et SCHEID (1961) (345) a permis aux auteurs de proposer la tyrosine comme acide aminé C - Terminal.

L'identification de l'acide aminé N - Terminal a été reprise par OSTROWSKI et Coll (1968) (346). La méthode au fluorodinitrobenzène, décrite par FRAENKEL - CONRAT et Coll (1959) (347), a conduit à l'isolement du di DNP - Histidine.

La présence d'histidine à l'extrémité N - Terminale de la chaîne protéique a été confirmée par la méthode au phénylisothiocyanate mise au point par EDMAN (1956) (348).

3. OSTROWSKI et Coll (1968) (349) ont soumis la riboflavoprotéine à l'hydrolyse trypsique, afin d'en préciser la structure.

L'étude des peptides obtenus, compte tenu des liaisons peptidiques hydrolysées par la trypsine, a permis aux auteurs de proposer pour la riboflavoprotéine, une molécule composée de deux sous-unités identiques.

d) Le groupement prosthétique

1. Détermination qualitative

ZAK et OSTROWSKI (1963) (350) ont isolé, par chromatographie sur gel de Sephadex à pH 3, le groupement prosthétique de la riboflavoprotéine. Le composé obtenu est étudié par électrophorèse et chromatographie sur papier, ses propriétés spectrales sont déterminées. L'examen de l'ensemble des résultats permet aux auteurs d'identifier avec certitude le composé isolé de la riboflavoprotéine comme étant la riboflavine.

Tableau XXI

Composition Centésimale et Molaire de la Riboflavoprotéine du Jaune d'Oeuf
OSTROWSKI et Coll (1968) (339)

Nature des Acides Aminés	g/100 g de Protéine	g/36 000 g	Nombre de Résidus/mole
Acide Aspartique	8,08	3 327	25,0
Acide Glutamique	12,34	5 046	34,3
Arginine	3,76	1 499	8,6
Histidine	4,21	1 707	11,0
Lysine	7,67	3 143	21,5
Alanine	3,33	1 479	16,6
Cystine / 2	5,75	2 342	19,5
Glycocolle	2,95	1 396	18,6
Isoleucine	2,95	1 233	9,4
Leucine	5,07	2 112	16,1
Méthionine	3,04	1 238	8,3
Phénylalanine	3,35	1 321	8,0
Proline	3,21	1 347	11,7
Sérine	11,51	5 118	48,7
Thréonine	3,05	1 309	11,0
Tryptophanne	3,99	1 572	7,7
Tyrosine	4,86	1 975	10,9
Valine	2,86	1 218	10,4
Total des Acides Aminés	91,98	32 954*	297,0

* Déduction faite des molécules d'eau.



2. Détermination quantitative

L'évaluation de la riboflavine a été faite par OSTROWSKI et Coll (1962) (351) selon deux techniques :

- L'une microbiologique à l'aide de *Lactobacillus Casei*, organisme pour lequel la vitamine B₂ est un facteur de croissance.

- L'autre spectrophotométrique.

Ces deux techniques ont été utilisées également par ZAK et OSTROWSKI (1963) (352) qui confirment les résultats obtenus selon lesquels la teneur en riboflavine de la riboflavoprotéine naissante se situe entre 6,4 et 7,3 mg/g de protéine, la saturation du composé étant obtenue lorsque 10,5 mg/g de protéine ont été fixés.

Les méthodes fluorométriques et polarographiques ont permis d'établir que la riboflavoprotéine native n'est saturée que de 60 à 70 %.

3. Fixation du groupement prosthétique sur la protéine

Il est dit plus haut que la riboflavoprotéine, outre la riboflavine, contient du phosphore (0,2 %). Ce phosphore, sous forme de radicaux phosphate, (OSTROWSKI et Coll - 1968) (353) augmente la charge négative de surface de la molécule. WEBER et Coll (1966) (354) ont montré que la déphosphorylation par la phosphomonoesterase modifie le comportement électrophorétique de la riboflavoprotéine mais n'altère que très légèrement les caractéristiques de la réaction immunologique du composé.

ZAK et Coll (1968) (355) , OSTROWSKI et Coll (1968) (356) ont établi des courbes de titration potentiométrique de la riboflavoprotéine de l'apodérivé et de la riboflavoprotéine dé-phosphorylée, les résultats obtenus, rassemblés au Tableau XXII (p. 75), montrent en particulier, que l'élimination de la riboflavine libre ou démasque des groupements carboxyles, imidazoles, α - aminés et phénoliques. Selon les auteurs, ces groupements ainsi que le noyau isocalloxazine de la riboflavine sont impliqués, par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques et covalentes, dans la fixation de vitamine sur la protéine.

Un travail plus récent (ZAK, STECZKO et OSTROWSKI - 1969)(357) a établi que la riboflavine peut se trouver dans la riboflavoprotéine du jaune sous trois formes différentes :

- Forme oxydée,
- Forme sémiquinonique,
- Forme réduite.

Tableau XXII

Titration Potentiométrique de la Riboflavoprotéine et des Composés Dérivés
Selon (OSTROWSKI et Coll - 1968) (356)

Protides	Groupements Ionisables		
	Carboxyles Phosphates pH 2,0 - 5,5	α - aminés Imidazoles pH 5,5 - 8,0	ε - aminés Phénoliques pH 8,0 - 11,0
Riboflavoprotéine	68	14	5
Apoprotéine	82	17	29
Riboflavoprotéine Déphosphorylée	21	23	12

C - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

Riboflavoprotéine et apoprotéine du jaune d'oeuf ont été étudiées en immunoélectrophorèse par WEBER et Coll (1966) (358), ZAK et Coll (1968) (359) selon la technique décrite par GRABAR et WILLIAMS (1955) (360) modifiée par SCHEIDEGGER (1955) (361). Les auteurs ont obtenu un seul arc de précipitation, montrant l'homogénéité de la préparation obtenue.

A l'aide de la technique mise au point par OUCHTERLONY (1948) (362) ils ont montré que la riboflavoprotéine et l'apoprotéine donnent la même réaction antigénique les arcs de précipitation obtenus se raccordant parfaitement.

WEBER et Coll (1966) (363) ont étudié en outre le comportement de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf vis à vis de l'immun-sérum préparé avec la riboflavoprotéine du jaune. Ils ont montré, par double diffusion, et par superposition des courbes de précipitation antigène-anticorps obtenues, que les deux riboflavoprotéines et l'apoprotéine du jaune sont "immunologiquement indiscernables".

Les auteurs ont étudié également l'influence, sur la riboflavoprotéine, de certaines enzymes (neuraminidase, phosphomonoesterase, pepsine, leucylaminopeptidase, carboxypeptidase) ainsi que celle de l'urée, sur la capacité de réaction immunologique et le comportement électrophorétique en gel d'agar.

Leurs résultats ont prouvé que seule, la pepsine réduit considérablement l'aptitude de la riboflavoprotéine à réagir avec l'anticorps.

D - RIBOFLAVOPROTEINES DU SERUM DE LA POULE, DU BLANC ET DU JAUNE D'OEUF.

Le premier, BLUM (1966) (364) a mis en évidence et isolé par électrophorèse préparative sur rideau une riboflavoprotéine dans le sérum de poule en période de ponte. Il a effectué des électrophorèses, comparatives sur papier, des riboflavoprotéines du sérum, du blanc et du jaune d'oeuf. Les électrophorégrammes obtenus ont permis de conclure que les mobilités électrophorétiques des trois composés dans le système tampon utilisé, sont comparables. Mais il n'a pas approfondi la comparaison ayant isolé une quantité trop faible de riboflavoprotéine sérique pour pouvoir en faire une étude complète.

JAKUBCZAK (1971) (365) a isolé, purifié et étudié en détail les propriétés physico-chimiques de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf.

Il a comparé ses résultats à ceux donnés par OSTROWSKI et Coll (1968) (366) à propos de la riboflavoprotéine du jaune.

Il a été amené à conclure que si les deux composés sont "immunologiquement indiscernables" (WEBER et Coll -1966) (367), leurs propriétés physico-chimiques présentent des différences sensibles, en particulier pour ce qui est du poids moléculaire, de la composition en glucides, en acides aminés et de la teneur en phosphore.

E - ROLE

Selon ZAK et OSTROWSKI (1963) (368) la riboflavoprotéine doit être rapprochée, du point de vue du rôle, du complexe avidine-biotine présent dans le blanc d'oeuf

Selon les auteurs, la riboflavoprotéine est un complexe macromoléculaire de la vitamine B₂ nécessaire au développement de l'embryon.

IV - LA TRANSFERRINE

En 1956, KAMINSKI et DURIEUX (369) ont montré l'identité immunologique de la conalbumine du blanc d'oeuf et de la transferrine de sérum de la poule, protéines possédant toutes deux la propriété de fixer le fer.

WILLIAMS (1962) (370) a étudié le diagramme immunoélectrophorétique donné par les livétines et a caractérisé un arc de précipitation ayant une mobilité électrophorétique comparable à celles de la conalbumine et de la transferrine sérique, correspondant à une β globuline.

WILLIAMS (371) a attribué cet arc de précipitation à la transferrine sérique présente dans les livétines.

Afin de confirmer l'hypothèse émise, WILLIAMS (1962) (372) a isolé et étudié la transferrine présente dans les livétines.

A - PREPARATION

La méthode de préparation décrite par WILLIAMS (1962) (373) comporte les étapes suivantes :

. Les livétines sont dissoutes dans l'eau pour réaliser une solution à 2 %.

. Cette solution est amenée à 50 % de saturation avec des cristaux de SO_4 $(\text{NH}_4)_2$. Le précipité formé est éliminé par filtration.

. La solution ainsi obtenue est amenée à 80 % de saturation. Le précipité obtenu est récupéré, dialysé contre de l'eau distillée et ensuite contre un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 5.

. La solution est alors soumise à l'analyse chromatographique sur carboxyméthylcellulose en colonne de 2,5 cm x 8,0 cm préalablement stabilisée avec la même solution tampon. La transferrine est fixée sous la forme d'un anneau rose.

. Les impuretés éliminées par passage du tampon de stabilisation de la résine échangeuse d'ion, la transferrine est alors éluée par le passage d'un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7.

. L'éluat est dialysé contre un tampon glycocholate 0,02 M de pH 6,5 et passé sur DEAE - Cellulose, en colonne de 2,5 cm x 5,0 cm, stabilisée dans ce tampon. La transferrine est retenue par l'échangeur d'ion.

. L'éluion est réalisée à l'aide d'un gradient continu de pH et de force ionique obtenu avec du phosphate de potassium.

. Après dialyse et lyophilisation, la fraction isolée se présente sous la forme d'une poudre teintée en rose.

B - PROPRIETES

Parallèlement à la transferrine présente dans les livétines, WILLIAMS (1962) (374) a isolé la transferrine sérique de la poule et la conalbumine du blanc d'oeuf, afin d'en faire une étude comparative.

1° - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE

Il a soumis les trois composés à l'analyse électrophorétique en gel d'amidon horizontal selon la technique décrite par SMITHIES (1955) (375) utilisant un système tampon discontinu mis au point par POULIK (1957) (376).

Les transferrines isolées, d'une part du sérum de la poule, d'autre part des livétines, présentent des images tout à fait identiques, tandis que la conalbumine isolée du blanc d'oeuf se comporte différemment des deux autres composés.

2°- ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

Etudiés en immunodiffusion, vis à vis d'un immun-sérum anti-sérum de poule, les trois composés donnent chacun une seule ligne de précipitation se raccordant parfaitement entre elles.

L'immunoélectrophorèse montre que la mobilité électrophorétique de la conalbumine est légèrement différente de celle des deux transferrines.

Par ailleurs, WILLIAMS (1962) (377) a montré par des réactions immunologiques croisées que plusieurs protéines des livétines présentent les mêmes réactions immunologiques que des protéines du sérum de poule.

A la suite de ces résultats, l'auteur (378) a été amené à conclure que le composé teinté en rose, isolé des livétines, n'est autre que la transferrine sérique de la poule.

3° - PROPRIETES CHIMIQUES

L'étude chimique de la transferrine isolée des livétines, faite par WILLIAMS (1962) (379) est sommaire. Considérant qu'il s'agit pour les deux transferrines, du jaune et du sérum d'un seul et même composé l'auteur a considéré, que les résultats obtenus à propos de la transferrine du sérum sont valables pour les transferrines du jaune, et n'a pas précisé dans certains cas, le milieu dont est extraite la transferrine étudiée.

a) Composition en glucides

La détermination des hexoses est faite, selon la méthode de SCHONENBERGER et Coll (1958) (380) à l'orséinol sulfurique.

Celle des hexosamines utilise la réaction d'Elson-Morgan selon la technique décrite par SCHULTZE et Coll (1958) (381).

Quant aux acides sialiques ils sont libérés par l'acide sulfurique 0,1 N à 98° C pendant une heure et dosés par la méthode au résorcinol chlorhydrique selon SVENNERHOLM (1958) (382).

Les compositions centésimales en glucides de la conalbumine d'une part et la transferrine d'autre part, sont différentes (Tableau XXIII - p. 80).

Soulignant ces différences WILLIAMS (1962) (383) a soumis la conalbumine et les deux transferrines à l'hydrolyse par la neuraminidase. L'action de cette enzyme, suivie par électrophorèse en gel d'amidon, modifie le comportement électrophorétique des deux transferrines mais ne change en rien celui de la conalbumine.

Tableau XXIII
Composition en Glucides de la Conalbumine et de la Transferrine
Selon WILLIAMS (1962) (383)

Glucides g/100 g	Conalbumine	Transferrine
Hexose	0,8	2,8
Hexosamine	1,4	1,4
Acide sialique	0	0,35



Ce point confirme que l'acide sialique fait bien partie intégrante des molécules des transferrines du jaune et du sérum, mais qu'il est absent dans la conalbumine.

La structure de la fraction glycoannique des deux composés : conalbumine et transferrine a été étudiée par WILLIAMS (1968) (384). Il a isolé par protéolyse des deux protéines, un certain nombre de glycopeptides. Les enzymes protéolytiques utilisées sont : la pepsine, la trypsine, et la chymotrypsine.

La détermination de la composition en sucre des glycopeptides isolés permet de conclure que les fractions glycoanniques des deux glycoprotéines sont différentes. La conalbumine (que l'auteur appelle également "ovotransferrine"), est composée d'une seule unité constituée de 4 résidus de mannose et de 8 résidus de N - acétyl - glucosamine. Quant au glycanne de la transferrine, il est composé de 2 résidus de mannose, 2 résidus de galactose, 3 résidus de N - acétyl - glucosamine et de 1 ou 2 résidus d'acide sialique.

L'auteur a proposé en outre pour les deux composés, des poids moléculaires semblables d'une valeur de 80.000.

b) Composition de la fraction protidique

1. Les compositions en acides aminés de la transferrine et de la conalbumine sont déterminées par WILLIAMS (1962) (385) selon la méthode mise au point par SPACKMAN, STEIN et MOORE (1958) (386) le tryptophane étant dosé par spectrophotométrie selon BENCZE et SCHMID (1957) (387). Les résultats obtenus figurent au Tableau XXIV (p. 82).

2. Appliquant la méthode au fluorodinitrobenzène de FRAENKEL - CONRAT et Coll (1952) (388), WILLIAMS (1962) (389) a proposé l'alanine comme acide aminé N - Terminal de la conalbumine et de la transferrine.

3. L'hydrolyse trypsique et chymotrypsique des deux transferrines (celle du sérum, celle du jaune) et de la conalbumine suivie d'une étude par électrochromatographie des peptides obtenus, conduit pour les trois composés, dans les mêmes conditions, à des schémas très voisins, presque superposables.

A l'aide de ces résultats, WILLIAMS (1968) (390) a déduit que :

- La transferrine présente dans le jaune d'oeuf est identique à la transferrine sérique de la poule,

- La transferrine et la conalbumine du blanc d'oeuf possèdent des fractions protidiques identiques mais différent par leur glycanne.

Tableau XXIV
 Composition en Acides Aminés de la Conalbumine et de la Transferrine
 Selon (WILLIAMS - 1962) (385)

Acides Aminés g/100 g de protéine	Conalbumine	Transferrine
Acide Aspartique	10,97	10,73
Acide glutamique	11,72	12,56
Arginine	6,73	6,89
Histidine	2,36	2,13
Lysine	10,38	10,31
Alanine	4,83	4,86
Cystine / 2	3,27	2,61
Glycocolle	4,32	-
Isoleucine	3,58	3,38
Leucine	7,06	7,54
Méthionine	1,81	1,89
Phénylalanine	4,92	4,55
Proline	4,11	3,87
Sérine	4,80	4,71
Thréonine	4,54	4,40
Tryptophanne	4,28	4,85
Tyrosine	4,33	4,22
Valine	5,99	6,19



V - LE VITELLOMUCOÏDE

C'est en 1936, que ONOE (391) a mis en évidence dans la fraction "livétine" du jaune d'oeuf une substance de nature glycoprotéique, riche en glucides, différente de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf, à laquelle il a donné le nom de vitellomucoïde.

A - PREPARATION

1° - PROCÉDES DE ONOE

ONOE (1936) (392) a décrit deux procédés de préparation permettant d'aboutir au vitellomucoïde.

a) Dans le premier procédé

10 jaunes d'oeuf débarrassés des chalazes et du blanc, sont émulsionnés dans un volume de NaCl à 8 %.

. Les lipides sont éliminés par des extractions répétées, en ampoule à décanter, avec un volume de mélange alcool - éther (25 :75) , puis par l'alcool.

. Quand la phase alcoolique est incolore, la solution aqueuse est traitée dans un courant d'air afin d'éliminer l'éther résiduel qu'elle contient et dialysée contre de l'eau distillée en présence d'une solution alcoolique de thymol.

. Le précipité de lipoprotéines est éliminé et la solution est concentrée par évaporation au bain-marie, jusqu'à obtention d'un volume de 50 ml.

. Le liquide est alors amené à demi saturation en sulfate d'ammonium afin de précipiter les livétines.

. L'ensemble est filtré et le filtrat est dialysé jusqu'à élimination des ions, sulfates, puis il est encore concentré à nouveau, au bain-marie bouillant, additionné de 5 à 10 volumes d'alcool.

. Le vitellomucoïde ainsi précipité, est purifié par redissolutions et reprecipitations successives par l'alcool.

. Cette technique permet de préparer environ 150 mg de vitellomucoïde (0,109 % du jaune).

b) Dans le second procédé

décrit par ONOE (1936) (393) 10 jaunes d'oeuf sont émulsionnés avec un volume de mélange éther-alcool (1 : 1), le précipité obtenu étant récupéré sur Buchner.

- . Ce dernier est ensuite mis en suspension et agité dans 600 ml d'eau.
- . Le mélange est alors additionné de 300 ml d'alcool à 95 %, acidifié à pH 5 avec de l'acide acétique à 30 % et bouilli à reflux .
- . Après 5 heures le résidu insoluble est éliminé et le vitellomucoïde est précipité par addition de 5 à 10 volumes d'alcool.
- . Il est enfin purifié par redissolution dans l'eau et reprécipitation à l'alcool.
- . Le rendement de ce second procédé est légèrement inférieur à celui que l'on obtient avec le premier.

2° - METHODE DE WILLIAMS

La méthode utilisée par WILLIAMS (1962) (394) dérive du premier-procédé décrit par ONOE (1936) (395). Toutefois, cet auteur a précisé certains points :

- . Les lipides sont extraits à l'éther, l'alcool, selon lui étant trop dénaturant pour les protéines.
- . Le filtrat obtenu après précipitation des livétines au sulfate d'ammonium, et concentration à l'évaporateur rotatif, est maintenu à ébullition pendant 5 minutes puis filtré.
- . La solution obtenue est additionnée de 5 volumes d'éthanol. Le vitellomucoïde, ainsi précipité, est récupéré, redissous dans l'eau, dialysé et lyophilisé.

3° - PREPARATION DU VITELLOMUCOÏDE SELON SEZILLE

Reprenant la préparation du vitellomucoïde, SEZILLE (1964) (396) a fait une étude critique de la méthode préconisée par ONOE (397) et des modifications apportées par WILLIAMS (398). Il a mis l'accent en particulier, sur le rôle joué par les filtrations au cours des différentes étapes de la préparation. Pour ce qui est de la "concentration à faible volume" avant précipitation des livétines au bain-marie bouillant, SEZILLE a souligné son imprécision, volume final et concentration jouant un grand rôle dans la "coagulation" des livétines par la chaleur, il en résulte un manque de reproductibilité dans les résultats ; le vitellomucoïde obtenu peut être plus ou moins pur.

B - PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

1° - PROPRIETES PHYSIQUES

Les données physiques, décrites par les auteurs concernant le vitellomucoïde sont relativement peu nombreuses.

a) Solubilité

La solubilité du vitellomucoïde dans différents milieux, a été rapportée par ONOE (1936) (399) et mise en parallèle avec celle de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf. Les deux constituants résistent à la chaleur, mais précipitent tous les deux d'une solution de sulfate d'ammonium à 2/3 de saturation.

Le vitellomucoïde, à l'inverse de l'ovomucoïde est difficile à précipiter par l'acide phosphotungstique à 25 %, mais précipite d'une solution de NaCl saturée.

WILLIAMS (1962) (400) a souligné qu'une solution de vitellomucoïde à 0,5 % additionnée d'acide sulfosalicylique 0,2 M devient trouble. Le même test réalisé avec une solution de livétine β provoque la formation d'un abondant précipité, caractère permettant de distinguer les deux composés.

Ce fait a été confirmé par SEZILLE (1964) (401) qui a étudié en outre le rôle de l'acide perchlorique, à différentes concentrations (0,2 M, 0,4 M, 0,6 M) sur des solutions de vitellomucoïde et de livétines. Ce réactif ne permet de précipiter ni le vitellomucoïde, ni la livétine β .

b) Pouvoir rotatoire

Le vitellomucoïde est actif sur la lumière polarisée, son pouvoir rotatoire spécifique a été donné par ONOE (1936) (402) :

$$(\alpha)_D^{22} = -24,7^\circ$$

L'auteur a souligné qu'il est différent de celui de l'ovomucoïde, pour lequel il a donné la valeur de :

$$(\alpha)_D = -63^\circ.$$

c) Point isoélectrique

Le point isoélectrique du vitellomucoïde a été déterminé par ONOE (1936) (403) par mesure de la viscosité de solutions de vitellomucoïde à différents pH, la viscosité minimale étant obtenue au pH correspondant au point isoélectrique.

Cette méthode a conduit l'auteur à proposer pour le vitellomucoïde un point isoélectrique égal à 5,5.

d) Comportement électrophorétique

WILLIAMS (1962) (404) a soumis le vitellomucoïde qu'il a obtenu à l'analyse électrophorétique sur papier et en gel d'amidon.

Dans les deux cas, le vitellomucoïde a un comportement identique à celui de la livétine β : ne présentant qu'une seule bande en électrophorèse sur papier, hétérogène en électrophorèse en gel d'amidon.

La mobilité électrophorétique du vitellomucoïde est celle d'une α_2 globuline.

Le comportement électrophorétique du vitellomucoïde a été étudié également par SEZILLE (1964) (405), qui a utilisé l'électrophorèse sur papier, en tampon véronal de pH 8,6 et en tampon pyridine, acide acétique, eau de pH 3,9, ainsi qu'en gel d'amidon selon la technique de WILLIAMS (1962) (406).

Selon cet auteur, quelque soit le système tampon utilisé, le vitellomucoïde possède la même vitesse de migration que la livétine β .

Conduite en tampon véronal de pH 8,6, l'électrophorèse sur papier montre la présence d'un composant apparemment homogène, tandis que, réalisé en tampon acide de pH 3,9, ce même type d'électrophorèse révèle l'hétérogénéité du vitellomucoïde, caractère que l'on retrouve sur les diagrammes obtenus avec le gel d'amidon.

Enfin, selon cet auteur, des modifications de structure qui interviennent à différents stades de la préparation, en particulier lors du traitement à l'éther, provoquent des différences de comportement électrophorétique d'une préparation à l'autre, les électrophorégrammes obtenus n'étant pas toujours superposables.

2° - PROPRIETES CHIMIQUES

a) Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire du vitellomucoïde conduite par ONOE (1936) (407) donne les résultats suivants :

C : 33,5 %,
H : 7,5 %,
N : 9,0 %,
S : 2,6 %.

L'auteur a signalé en outre la présence de calcium dans le résidu de combustion

b) Composition en Glucides

La glucosamine a été identifiée dans les préparations de vitellomucoïde sous la forme de son dérivé tétrabenzoylé par ONOE (1936) (408). Ce dernier a dosé la glucosamine présente dans le vitellomucoïde à l'aide d'un réactif au p - diméthylaminobenzaldehyde et a proposé la teneur de 10,1 %.

A côté de la glucosamine, ONOE (1936) (409) a signalé la présence de 20,2 % de mannose dans le vitellomucoïde. Le rapport mannose/glucosamine est donc de 2, valeur différente de celle du même rapport, donné par cet auteur à propos de l'ovomucoïde, qui est de 1. Il s'agit donc là d'un nouveau caractère distinctif entre les deux constituants.

WILLIAMS (1962) (410) a donné une composition glucidique plus détaillée :

Hexose	: 7,8 %,
Hexosamine	: 5,5 %,
Acide Sialique	: 2,0 %.

Cette composition est, selon lui, identique à celle de la livétine β .

Ayant utilisé les techniques de dosages préconisées par MONTREUIL et SPIK (1963) (411), et effectué ses dosages sur plusieurs préparations, SEZILLE (1964) (412) a rapporté les teneurs moyennes suivantes :

Oses Neutres	: 11,5 %,
Acide Sialique	: 4,3 %.

L'auteur a souligné la richesse en acide sialique, par rapport aux livétines et par rapport également aux teneurs données par WILLIAMS, tant pour le vitellomucoïde que pour la livétine β .

Selon SEZILLE (1964) (413) la composition molaire est la suivante : Galactose, Glucose, Mannose (1 : 1 : 2).

De ces résultats, l'auteur a déduit à la suite de ONOE (1936) (414) que le vitellomucoïde est un composé nettement individualisé du jaune d'oeuf de poule.

VI - CONSTITUANTS SOLUBLES DIVERS

La présence de constituants hydrosolubles, de différents types, a été signalée dans le jaune d'oeuf :

A - UN COMPLEXE PROTEIQUE DE LA VITAMINE B₁₂

Ce complexe a été mis en évidence par OSTROWSKI et Coll (1962) (415), ZAK et OSTROWSKI (1963) (416).

B - DES ENZYMES

La majeure partie des travaux effectués sur les enzymes de l'oeuf portent sur leur rôle au cours de l'incubation. Ils sont rapportés dans les ouvrages de NEEDHAM (1931) (1942) (417) (418).

A la suite de ces travaux, LINEWEAVER et Coll (1948) (419) ont mis en évidence et déterminé l'activité d'un certain nombre d'enzymes présentes dans l'oeuf et en particulier dans le jaune :

Parmi ces enzymes se trouvent des Esterases : Tributyrylase et Cholinesterase essentiellement, selon les auteurs, ces enzymes sont localisées dans la fraction "livétine".

Le jaune d'oeuf possède également une activité phosphatasique, due à la présence d'une phosphatase alcaline. Cette enzyme, contrairement aux deux précédentes, ne se retrouve que pour une faible part dans la fraction "livétine".

A côté de ces enzymes, le jaune d'oeuf contient une amylase, extraite dans la fraction hydrosoluble.

Enfin, les auteurs ont signalé la présence en faible quantité, d'une peptidase et d'une catalase, enzyme localisée principalement dans le blanc d'oeuf.

Ils n'ont pas réussi, en outre, à mettre en évidence de lipase hydrolysant les lipides contenant des acides gras à 6 atomes de carbone et plus, de phénol-oxydase, de cytochrome-oxydase et de péroxydase.

C - DES PROTEINES DU BLANC D'OEUF

A l'aide de réaction immunologique, MARSHALL et DEUTSCH (1951) (420) ont montré que les protéines totales du jaune d'oeuf contiennent 0,2 % d'ovalbumine et 4 % de conalbumine. Or concernant cette dernière, WILLIAMS (1962) (421) a rapporté qu'elle présente la même réaction immunologique que la transferrine présente dans le jaune, mais que les deux constituants ne peuvent être confondus du fait de leurs comportements électrophorétiques différents. (voir plus haut).

La présence d'ovalbumine dans le jaune a été confirmée par SAITO et MARTIN (1965) (422).

D'après MARSHALL et DEUTSCH (1951) (423) le jaune d'oeuf ne contient ni lysozyme ni ovomucoïde.

D - COMPOSANTS DIALYSABLES

1° - LE GLUCOSE

Le jaune d'oeuf renferme seulement 25 % des glucides totaux présents dans l'oeuf (JACQUOT et ADRIAN - 1954) (424).

Selon les mêmes auteurs, le jaune d'oeuf renferme 1 % de glucides dont 0,7 % de glucose libre.

JACQUOT et ADRIAN (1954) (425) ont rapporté la présence, à côté du glucose libre, de substances organiques : acide citrique, lactique, inositol et éthanol. Certains de ces corps sont apparemment des produits du catabolisme (acide lactique) d'autre au contraire des produits de l'anabolisme embryonnaire (inositol).

2° - LES ACIDES AMINES

Dans l'oeuf fraîchement pondu, le jaune contient des acides aminés libres, le blanc en est dépourvu.

La composition et la teneur du jaune en acides aminés libres dépend directement de la ration alimentaire.

En 1966, BRAY et KELLY (426) ont étudié de ce point de vue, l'influence de l'apport alimentaire sur la teneur en lysine libre du jaune.

A la suite des travaux de LARBIER et Coll (1972) (427) concernant la méthionine et la lysine, il semble qu'un déséquilibre de la ration se traduise par un appauvrissement intéressant également tous les acides aminés libres. Les auteurs en déduisent que ces acides aminés n'ont vraisemblablement pas une origine sanguine, mais proviennent plutôt de la dégradation des protéines entourant l'ovocyte.

Beaucoup d'énigmes restent à résoudre concernant les acides aminés libres : leurs proportions relatives, leur origine et leur rôle sont encore inconnus.

3° - LES COMPOSANTS MINÉRAUX : MACROÉLÉMENTS ET OLIGOÉLÉMENTS

La teneur de l'oeuf en ces différents constituants est donnée par ROMANOFF et ROMANOFF (1949) (428) et JACQUOT et ADRIAN (1954) (429).

Les macroéléments sont, pour la plupart, combinés avec les substances organiques. Ce sont : le calcium, le phosphore, le sodium, le chlore, le magnésium, le fer, le potassium, et le soufre, représentant environ 1,2 % du jaune.

Parmi les oligoéléments présents dans le jaune, il faut citer le fluor, l'iode, le cuivre, le zinc, l'aluminium et la manganèse, oligoéléments majeurs.

CONCLUSION

Le jaune d'oeuf apparait comme un substrat complexe, par la nature et le nombre des constituants qu'il renferme. Cette complexité est schématisée par la Figure 11 (p. 91) qui est un bilan de composition du jaune d'oeuf.

Les données que l'on possède actuellement sur le jaune d'oeuf sont souvent incomplètes, voire incertaines, en particulier celles qui se rapportent à la fraction hydrosoluble. Il s'agit là de composés mineurs, quantitativement, mais il n'est pas douteux, de par la filiation de certains d'entre eux, avec les protéines sériques de la poule, qu'ils jouent un rôle important lors de la mise en incubation de l'oeuf. Cette filiation est elle-même imprécise et peut être y aurait-il lieu de l'étendre à d'autres constituants tels que le vitellomucoïde.

Pour mener à bien ce travail, il conviendrait, tout d'abord, d'isoler à l'état pur les différents constituants du jaune d'oeuf, afin d'en étudier les propriétés puis de fractionner le sérum de poule dans le but d'établir une comparaison exhaustive des propriétés des constituants présentant cette filiation. Telle est la mission dont nous avons été initialement chargés.

Isoler les différents constituants de cette fraction soluble, directement à partir du jaune d'oeuf, était une possibilité à envisager. Dans certains cas, elle permet d'arriver au résultat. Mais d'une façon générale, étant donnée la complexité

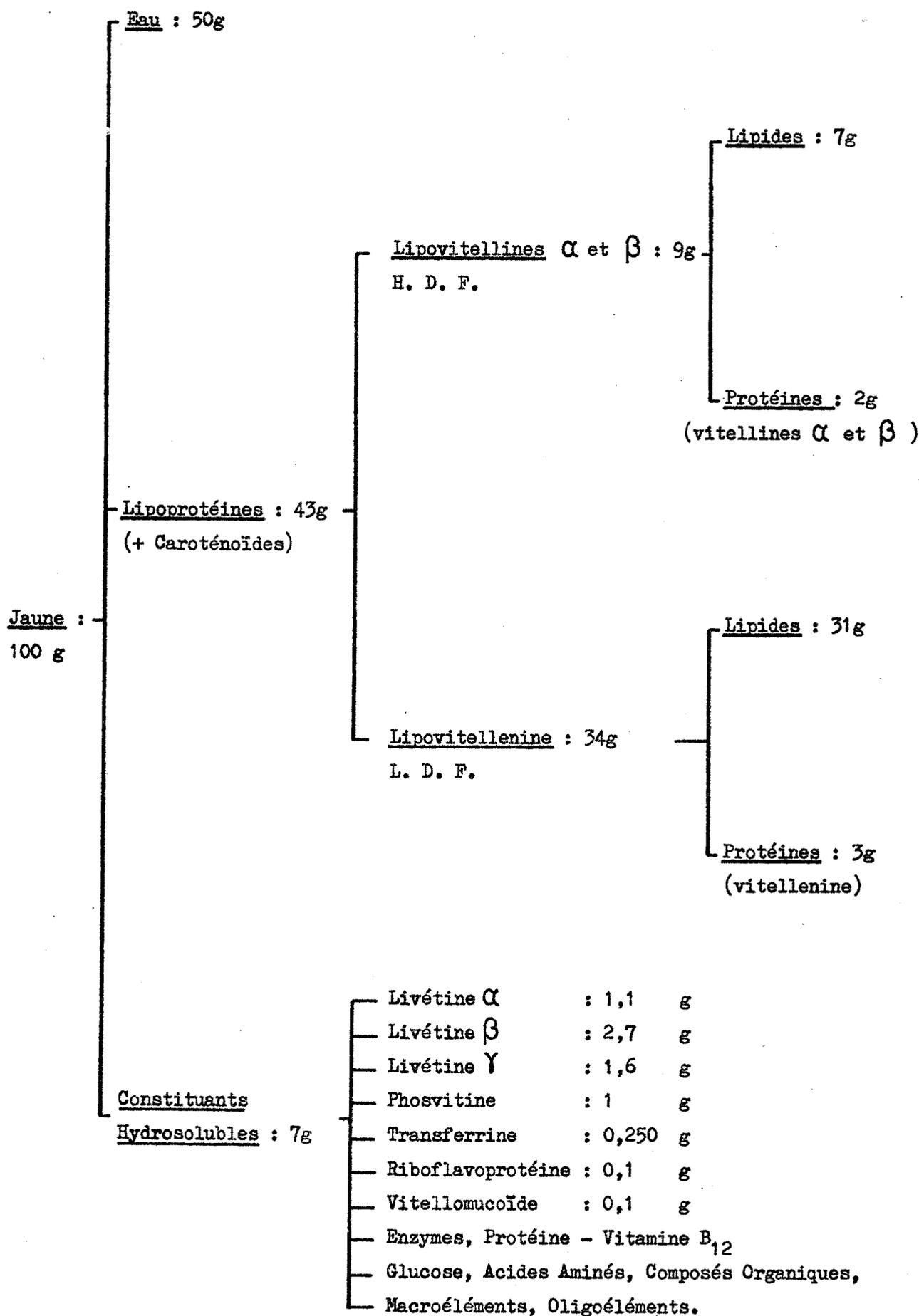


Figure 11
Composition Globale du Jaune d'Oeuf

du jaune d'oeuf, le fractionnement des protéines hydrosolubles semblait susceptible de faciliter la tâche. Aussi, fallait-il donc commencer par extraire les constituants hydrosolubles en éliminant les composés de nature lipidique.

Ce matériel d'étude ainsi préparé, nous avons été amenés à en tester l'hétérogénéité par des méthodes de l'analyse immédiate : électrophorèse et immuno-électrophorèse.

Ayant mis au point des techniques analytiques précises, il nous restait à entreprendre le fractionnement des protéines solubles totales, tâche de longue haleine, les mélanges protéiques obtenus présentant une grande hétérogénéité. Ce travail nous a conduit, jusqu'à présent, à l'isolement de deux constituants dans un état de pureté convenable.

Nous allons maintenant exposer le résultat de ces travaux.

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

Les techniques d'analyse et de fractionnement des mélanges protéiques ont beaucoup évolué depuis la publication des travaux réalisés sur la fraction hydrosoluble du jaune d'oeuf.

La mise en oeuvre de techniques modernes, telles que l'électrophorèse sur acétate de cellulose ou en gel de polyacrylamide et la chromatographie d'échange d'ion sur des supports tout à fait au point, était susceptible de faire progresser la connaissance de ce substrat.

Ces techniques nous ont permis d'acquérir quelques renseignements complémentaires intéressants, d'une part sur les protéines solubles du jaune d'oeuf, et d'autre part sur les constituants que nous avons été amenés à étudier.

1 - ETUDE DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES DU JAUNE D'OEUF

I - PREPARATION DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES

DU JAUNE D'OEUF

La littérature propose des méthodes de préparation des "livétines", appelées encore "fraction livétine", et les auteurs distinguent trois constituants : α , β et γ , dans les "livétines".

L'étude immunoélectrophorétique réalisée par WILLIAMS (1962) (430) d'une part, MOK et Coll (1964) (431) d'autre part, permet de mettre en évidence, dans cette fraction, six constituants antigéniques.

Nous savons, par ailleurs, qu'à côté des constituants α , β et γ livétines se trouvent d'autres protéides hydrosolubles : transferrine, riboflavoprotéine.

Cela nous amène à penser que le terme de "livétine" est ambigu et nous lui préférons, dans cette étude, celui plus général de protéines solubles totales du jaune d'oeuf (P.S.T.).

A - MODES OPERATOIRES

1° - METHODES DE PREPARATION DES LIVETINES

Nous envisagerons, tout d'abord, les méthodes décrites par les auteurs à propos de la préparation des "livétines". Ces méthodes ont été envisagées brièvement dans l'étude bibliographique (p. 36).

Afin de pouvoir être comparées, toutes les préparations décrites sont effectuées sur 900 ml de jaune, volume correspondant environ à 100 oeufs. Dans tous les cas, le jaune d'oeuf est soigneusement séparé du blanc et récupéré par ponction à travers la membrane vitelline.

a) Les méthodes proposées par SHEPPARD et HOTTLE (1949) (432) sont schématisées dans les plans de fractionnement donnés aux Figures 12 et 13 (p. 97 et 98). Ce sont les méthodes 1 et 1 bis, conduisant aux PST - 1 et PST - 1 bis.

. Dans la méthode 1, un volume de jaune est dilué avec deux volumes de NaCl à 0,85 % et le tout est émulsionné avec deux volumes d'éther éthylique à - 20° C.

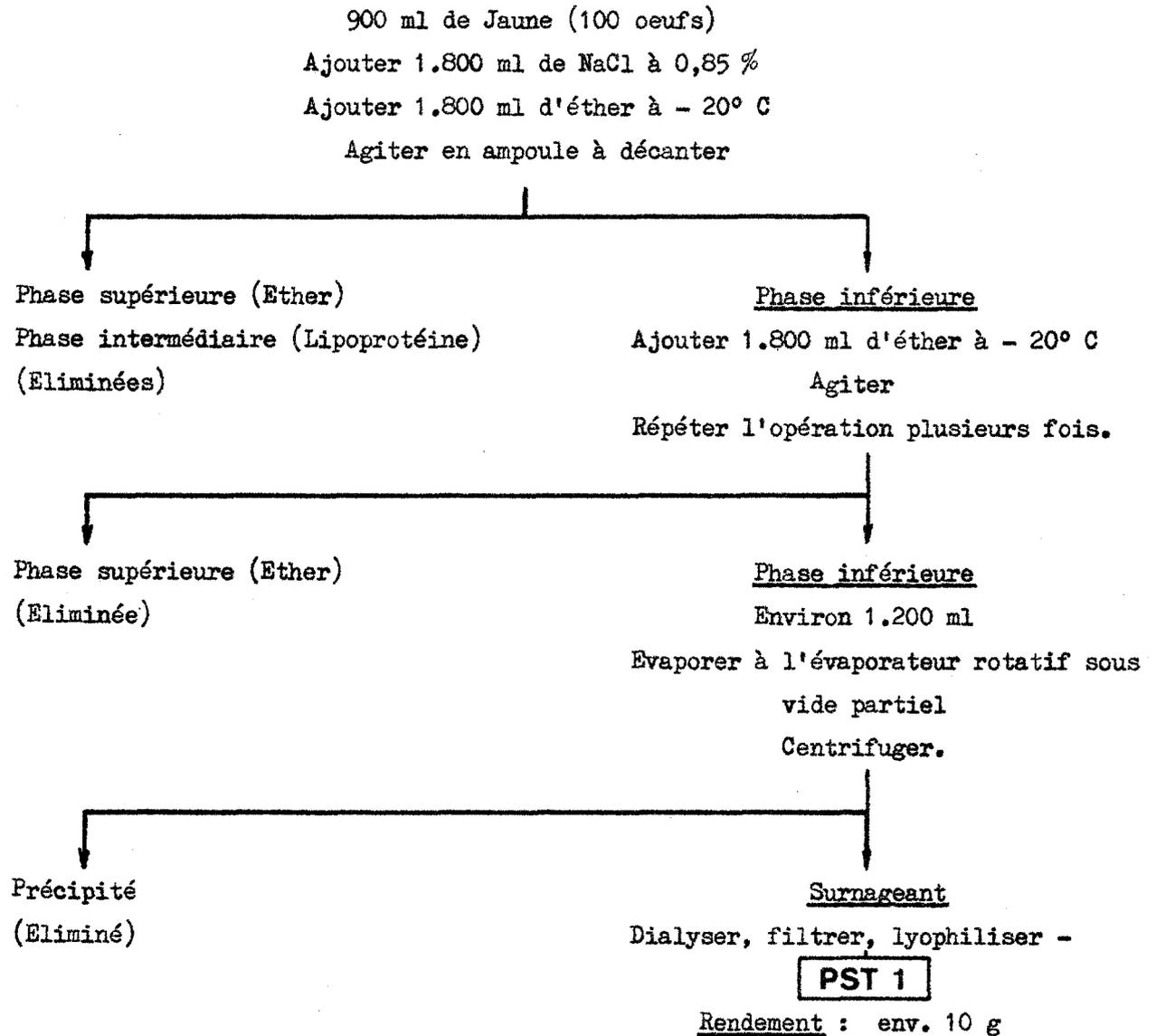


Figure 12

PREPARATION DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES DU JAUNE

Méthode 1

Selon SHEPPARD et HOTTLE (1949) (432)

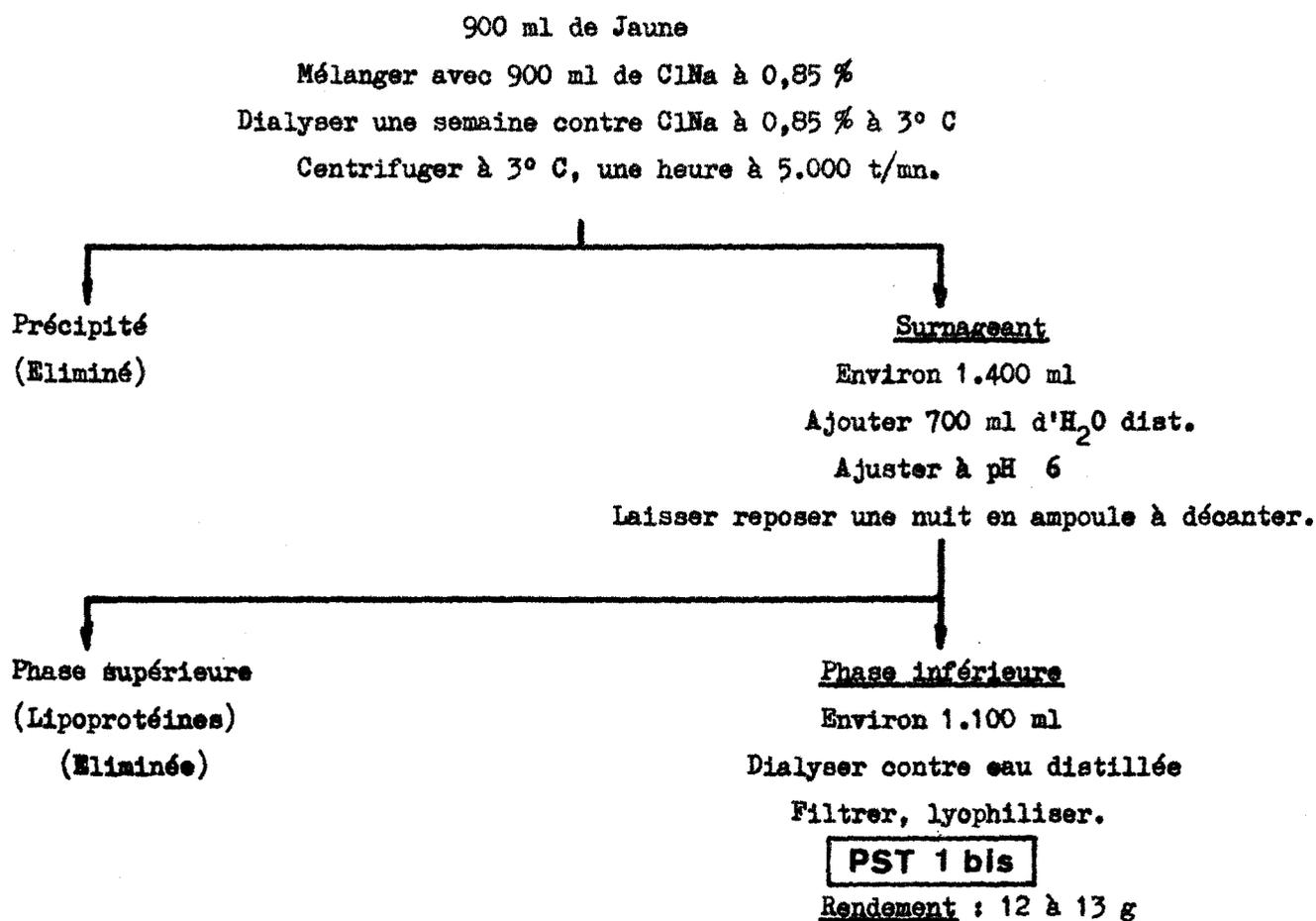


Figure 13

PREPARATION DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES DU JAUNE

Méthode 1 bis

Selon SHEPPARD et HOTTLE (1949) (432)

Ce mélange conduit à la formation de trois phases. La phase inférieure soumise à de nouvelles extractions étherées, est ensuite évaporée, centrifugée, dialysée, filtrée et lyophilisée. On récupère environ 10 g d'une poudre légèrement teintée en jaune (PST - 1).

. La méthode 1 bis est la seule méthode décrite, n'utilisant pas d'extractions étherées pour éliminer les lipides et les lipoprotéines. La solution obtenue, à la fin de la préparation, contenant les protéines solubles totales (PST - 1 bis), est trouble. Cette méthode permet la récupération de 12 à 13 g d'une poudre jaunâtre, à partir de 900 ml de jaune d'oeuf. La remise en solution est imparfaite.

b) La méthode 2 proposée par KNIGHT et SCHECHTMAN (1954) (433), (Figure 14, p. 100), utilise du NaCl à 10 % comme agent de dilution du jaune d'oeuf. Le mélange avec l'éther conduit à deux phases. La lyophilisation, dernière étape, permet de récupérer une poudre jaune pâle (10 à 12 g) (PST - 2).

c) MARTIN et Coll (1957) (434) décrivent une méthode de préparation dans laquelle l'agent de dilution du jaune d'oeuf est l'eau distillée (Figure 15, p. 101). Après élimination du précipité formé, le liquide obtenu est extrait à l'éther, ce qui conduit à l'obtention de trois phases. La phase aqueuse, après traitement, est lyophilisée. On récupère environ 10 g d'une poudre blanche (PST - 3).

2° - AUTRES METHODES DE PREPARATION

Certains auteurs ont décrit des méthodes de préparation d'un constituant de la fraction hydrosoluble (riboflavoprotéine, vitellomucoïde), directement, à partir du jaune d'oeuf, en deux étapes :

- La première étape est en fait une extraction des lipides et lipoprotéines conduisant à une phase aqueuse,

- La deuxième étape consiste en un fractionnement de cette phase aqueuse et conduit au constituant recherché.

La réalisation de la première étape uniquement fournit donc un mélange des protéines solubles totales.

a) Ainsi, ZAK et Coll (1963) (435) obtiennent la riboflavoprotéine du jaune en fractionnant au sulfate d'ammonium la phase aqueuse qu'ils ont préparée selon le schéma que nous avons repris à la Figure 16 (p. 102). L'agent de dilution du jaune d'oeuf utilisé est le NaCl à 0,85 %. Après émulsion avec de l'éther, on aboutit à la formation de trois phases. La phase aqueuse est lyophilisée, au lieu d'être fractionnée à l'aide du sulfate d'ammonium selon la technique décrite par les auteurs.



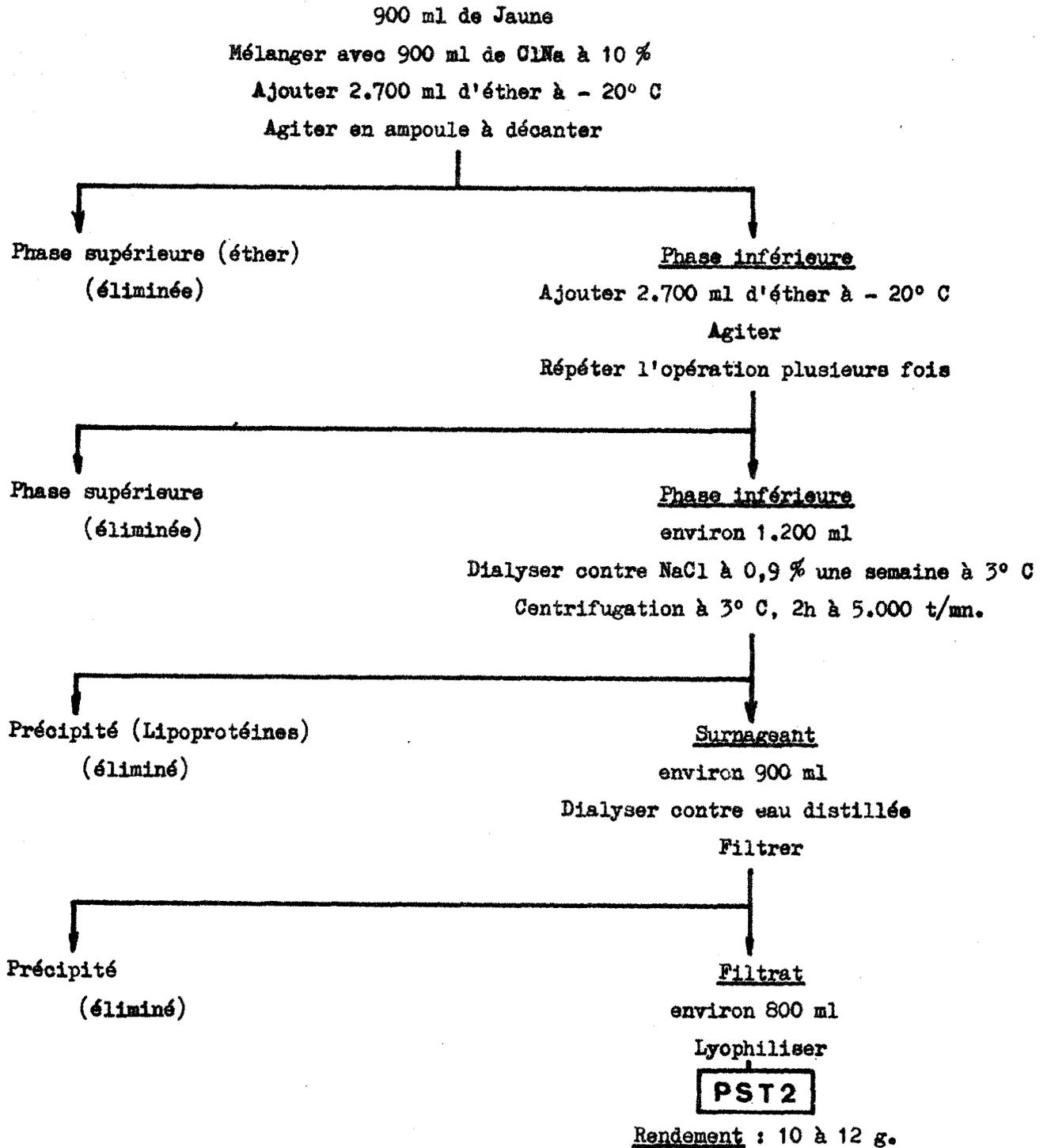


Figure 14
Préparation des Protéines Solubles Totales du Jaune
Méthode 2

Selon KNIGHT et SCHECHTMAN (1954) (433)



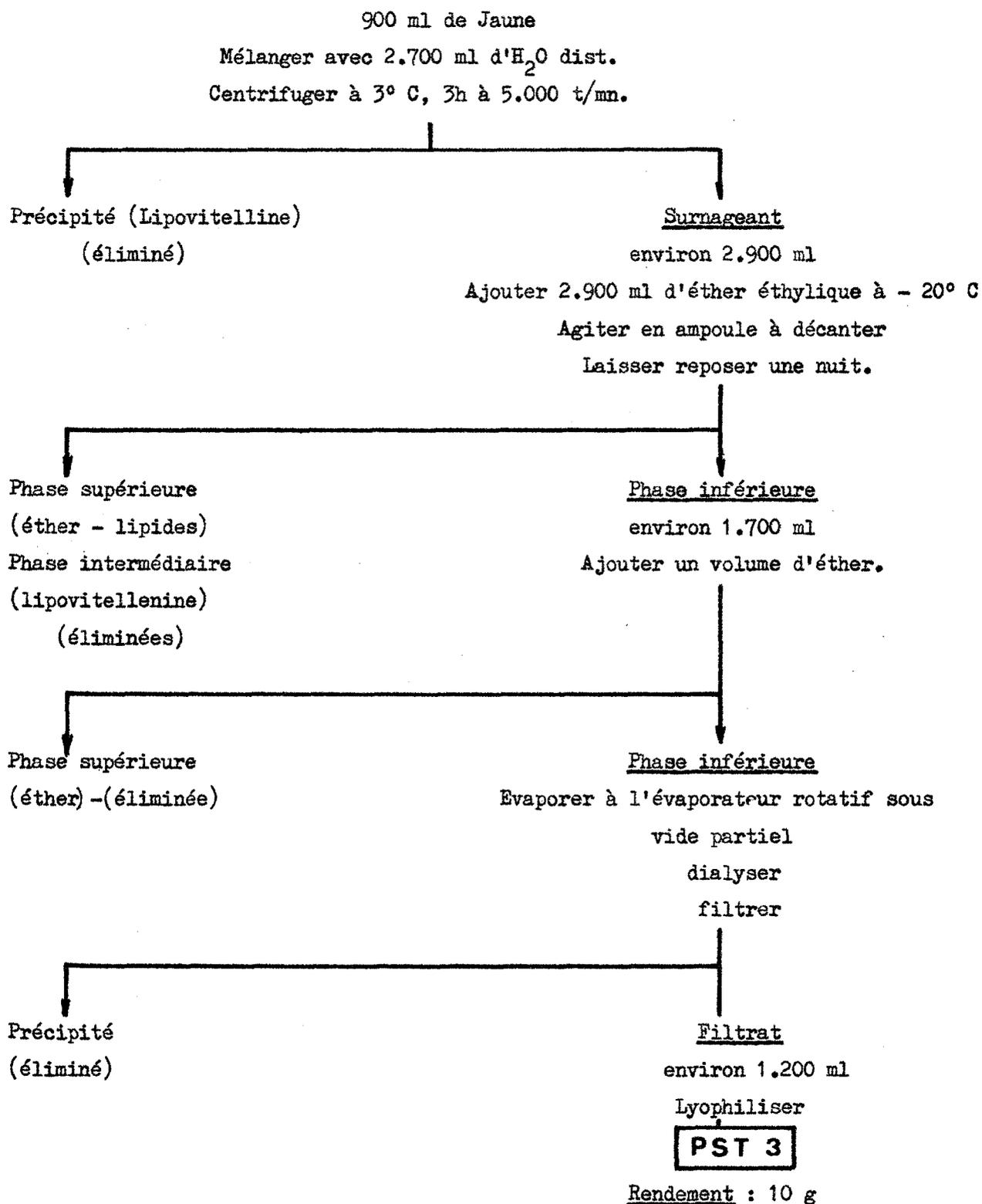


Figure 15
Préparation des Protéines Solubles Totales du Jaune
Méthode 3

Selon MARTIN, VANDEGAER et COOK (1957) (434)



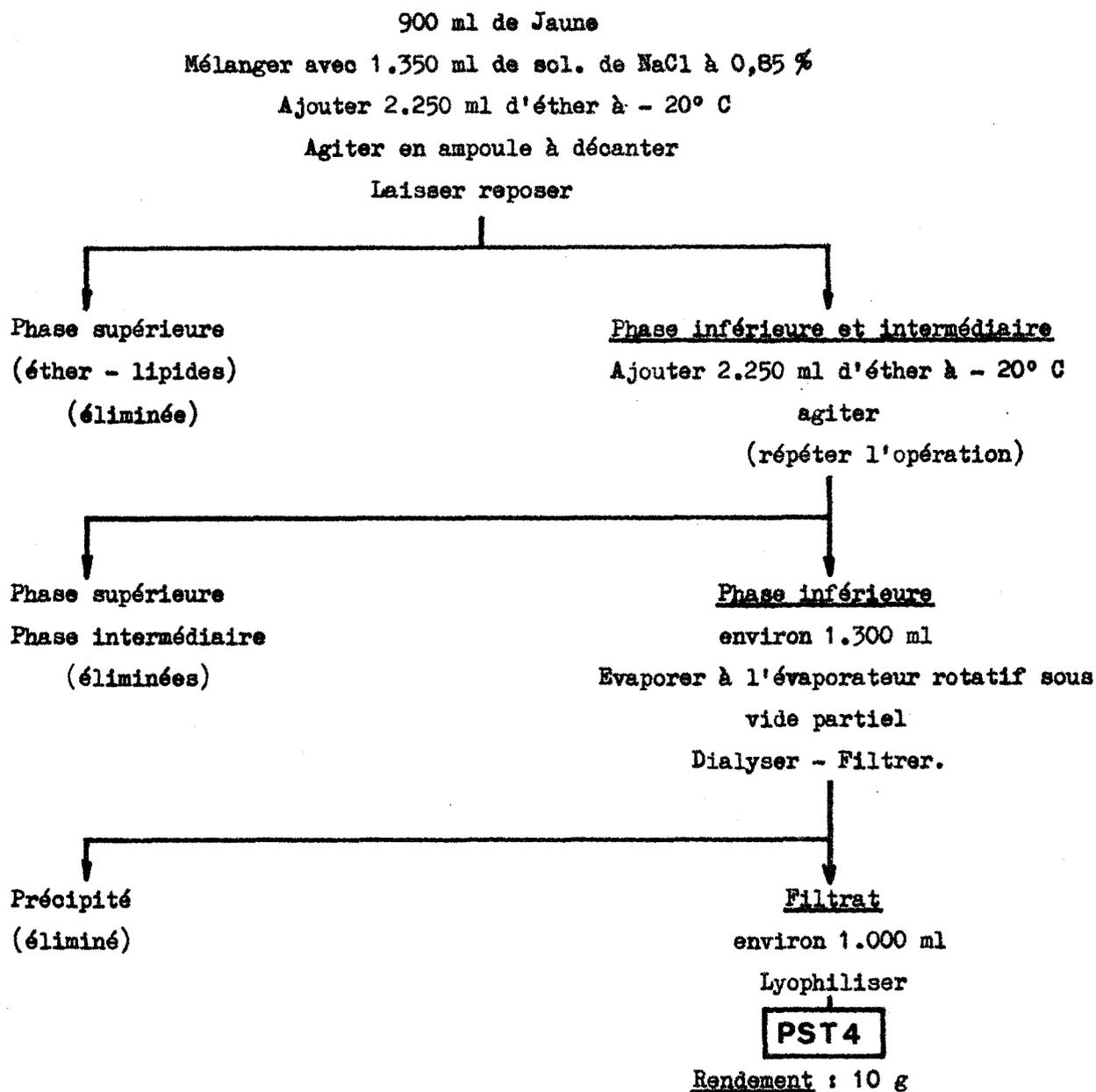


Figure 16

Préparation des Protéines Solubles Totales du Jaune

Dérivée de la Préparation de la Riboflavoprotéine

Méthode 4

Selon ZAK et Coll (1963) (435)

La poudre récupérée (10 g environ), contenant la riboflavoprotéine, est légèrement jaune (PST - 4).

b) ONOE (1936) (436) procède de façon tout à fait analogue pour préparer le vitellomucoïde. La réalisation de la première étape du procédé décrit constitue un procédé de préparation des protéines solubles totales, il s'agit de la méthode 5 schématisée à la Figure 17 (p. 104). Dans cette méthode, l'agent de dilution du jaune d'oeuf est de NaCl à 8 %. Après extraction étherée, deux phases se forment. La phase aqueuse, après de nouvelles extractions à l'éther, évaporation, dialyse et lyophilisation conduit à une poudre jaune pâle (10 à 12 g) (PST - 5), contenant le vitellomucoïde.

B - RESULTATS - CONCLUSIONS

1. Les rendements des préparations décrites sont faibles.

D'après les données bibliographiques, le jaune d'oeuf contient environ 7 % (en poids) de protides hydrosolubles. Les rendements des différentes préparations sont en moyenne de 1 %. Cela peut s'expliquer en partie par les pertes de phase aqueuse qui ont lieu lors de sa récupération. On a intérêt à préparer une phase aqueuse exempte des autres phases, afin d'éviter la récupération de lipoprotéines qui viendraient troubler les solutions. Il est donc préférable de ne pas prélever toute la phase aqueuse après décantation, mais plutôt d'en abandonner une partie, la plus faible possible, dans les ampoules à décanter. On a donc de ce fait une baisse du rendement.

2. Le rendement de la méthode 1 bis est supérieur à celui des autres procédés.

Selon SHEPPARD et HOTTLE (1949) (437) le mélange ainsi obtenu contient des lipides non extraits. Ce fait expliquerait le rendement légèrement supérieur obtenu. D'autre part, les solutions obtenues sont troubles et la remise en solution est moins satisfaisante que lorsque l'éther est employé. On peut donc en déduire que le mélange obtenu par la méthode 1 bis (PST - 1 bis) contient des lipides ou des lipoprotéines résiduels non extraits.

3. Dans chacune des méthodes de préparation la première étape consiste en une dilution du jaune d'oeuf. L'agent de dilution peut être :

- L'eau distillée (méthode 3),
- Le NaCl à 0,85 % (méthodes 1, 1 bis, 4),
- Le NaCl à 10 ou 8 % (méthodes 2 et 5).

Cela permet de rapprocher les méthodes 1 et 4, d'une part, 2 et 5 d'autre part. Le parallèle établi, montre qu'en fait, les plans de fractionnement correspondant aux méthodes 1 et 4 sont pratiquement superposables : obtention de 3 phases après

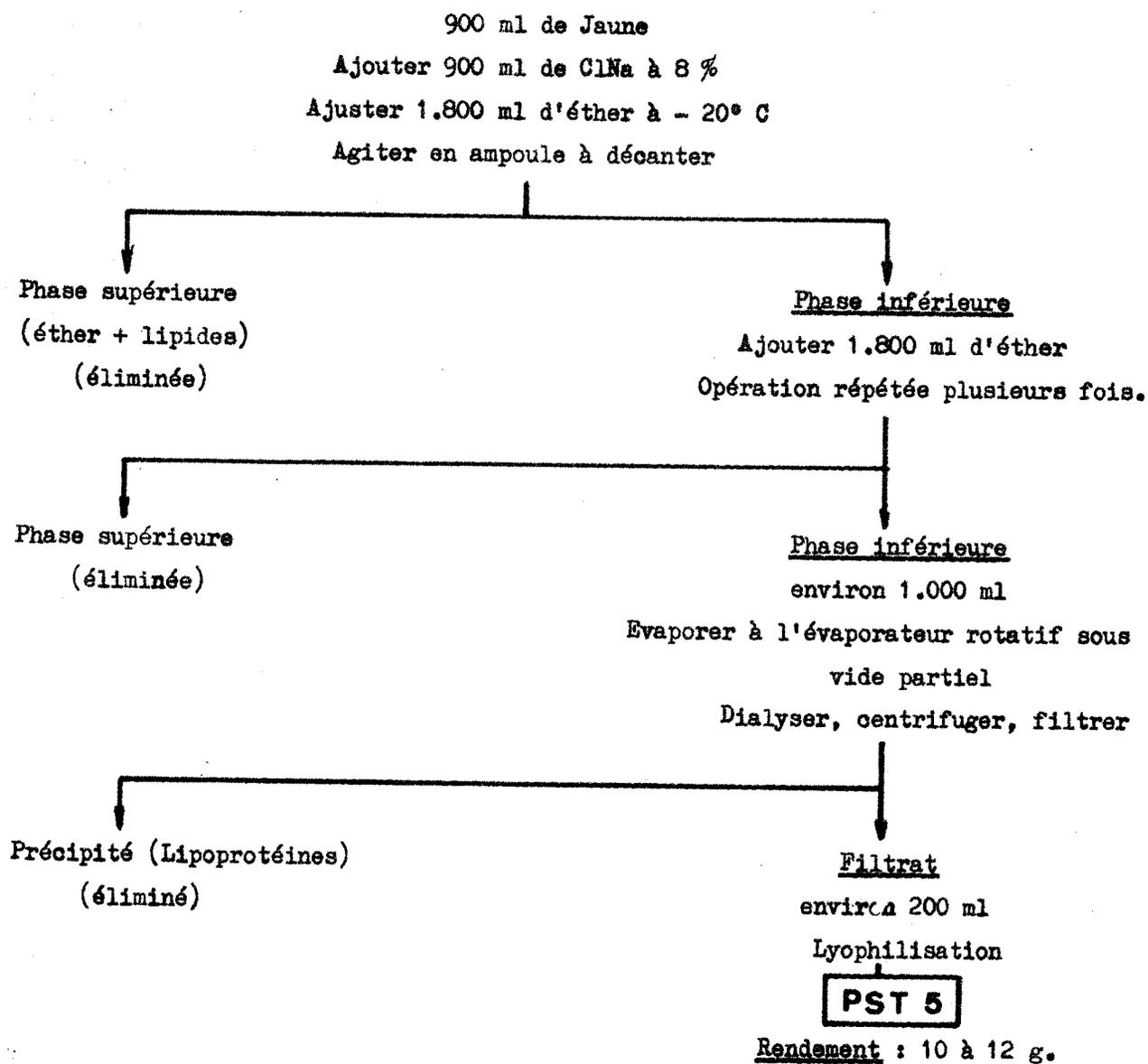


Figure 17
Préparation des Protéines Solubles Totales du Jaune
Dérivée de la Préparation du Vitellomucoïde
Méthode 5
Selon ONOE (1936) (436)

émulsion avec l'éther, récupération d'une poudre jaune pâle. De la même façon, les méthodes 2 et 5 sont à rapprocher. Ces deux méthodes présentent cependant une différence : dans la méthode 2, l'éther résiduel est éliminé par dialyse au lieu d'être éliminé par évaporation (méthode 5).

4. Les protéines solubles totales ont été soumises systématiquement au microdosage des glucides. Nous avons utilisé les méthodes de dosage préconisées par MONTREUIL et SPIK (1963) (438). Les valeurs moyennes que nous avons obtenues, à partir d'un grand nombre de déterminations, sont rassemblées au Tableau XXV (p. 106) à côté de celles que propose SEZILLE (1964) (439) pour la livétine, mélange protéique correspondant à notre PST - 3. Appliquant les mêmes méthodes de dosage, nous n'avons jamais obtenu une teneur en oses neutres de 7,5 %, mais toujours une teneur inférieure. Par contre, la teneur moyenne en acide sialique à laquelle nous aboutissons est supérieure à celle que donne SEZILLE.

C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LES METHODES DE PREPARATION

DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES.

Les procédés de préparation des protéines solubles totales peuvent être ramenés à trois; nous avons choisi les méthodes 3, 4 et 5, pour les raisons suivantes :

- Le choix de la méthode 3 s'imposait, cette méthode étant la seule à utiliser l'eau distillée comme agent de dilution,
- Quant aux méthodes 4 et 5, elles constituent, comme nous l'avons vu, la première étape, respectivement, de la préparation de la riboflavoprotéine et du vitellomucoïde. Les mélanges 4 et 5 nous ont paru tout à fait indiqués pour préparer ces composés,
- Enfin, la méthode 1 bis, conduisant à un mélange des protéines solubles imparfaitement délipidées, ne pouvait être retenue.

II - ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES

PROTEINES SOLUBLES TOTALES.

Tableau XXV
 Composition en Glucides des Protéines
 Solubles Totales du Jaune d'Oeuf

Glucides en p. 100	Résultats Personnels	Résultats* de <u>SEZILLE</u> (439)
Oses "neutres"	5,5	7,5
Osamines	3,3	-
Acide Sialique	2,0	1,64

* Résultats donnés à propos de la "livétine" correspondant à notre PST - 3. Les glucides sont dosés par les méthodes préconisées par MONTREUIL et SPIK (1963) (440).



A - ETUDE ELECTROPHORETIQUE

Nous avons mis en évidence l'analogie qui existe entre les différents procédés de préparation des protéines solubles totales.

L'analyse chimique (composition en glucides) ne permet pas de caractériser d'un mélange à l'autre, de différence significative.

L'analyse électrophorétique, réalisée systématiquement sur tous les mélanges protéiques obtenus, montre des différences, d'un mélange à l'autre. Mais les électrophorogrammes correspondant aux mélanges 1, 2, 4 et 5, permettent de poursuivre le rapprochement fait à propos des méthodes de préparation. En effet, les mélanges 1 et 4 d'une part, 2 et 5 d'autre part, donnent dans tous les cas, des images tout à fait comparables.

L'étude électrophorétique se ramène donc à celle des PST - 3, PST - 4 et PST - 5.

1° - MODES OPERATOIRES

Nous ne décrivons pas en détail les techniques d'électrophorèses sur papier, en gel d'agar et sur acétate de cellulose, techniques classiques.

Nous avons été amenés à employer le gel de polyacrylamide et le gel mixte d'acrylamide - agarose. Ce dernier, facile d'emploi, nous a conduit à des résultats satisfaisants. Nous décrivons la technique d'utilisation de ce support.

a) Electrophorèse sur papier en gel d'agar et sur acétate de cellulose

Les électrophorèses sont réalisées en tampon véronal de pH 8,65 et de force ionique 0,07, et révélées à l'amidoschwartz.

La séparation électrophorétique sur papier est obtenue avec du matériel de marque LKB. Les mélanges PST - 3, PST - 4 et PST - 5 sont appliqués en solution à 20 % dans le tampon d'électrophorèse.

L'agar - agar* est utilisé en gel à 1,5 %. Avant révélation, les plaques sont fixées dans un mélange alcool éthylique, acide acétique (100 : 2 v/v).

Les protéines solubles totales sont mises en solution à 5 % dans l'eau distillée avant d'être soumises à l'analyse électrophorétique en gelose et sur acétate de cellulose**.

* Agar - agar : Spécial Agar Noble - Difco : 0142 - 02.

** Acétate de Cellulose : Cellogel - SEBIA - PARIS.

b) Electrophorèse en gel mixte d'acrylamide - agarose

Nous avons préféré ce support au gel de polyacrylamide étant données ses propriétés : il permet d'obtenir une bonne résolution, comparable à celle du gel de polyacrylamide, mais surtout, il possède d'excellentes propriétés mécaniques et de ce fait, en plaque, il est beaucoup plus facile à manipuler que celui-ci. Enfin, il peut être séché, dans de meilleures conditions : on obtient une pellicule que l'on peut densitométriser et qui se conserve parfaitement.

La technique d'utilisation des gels d'acrylamide - agarose a été décrite par URIEL (1966) (441). Actuellement, le gel est vendu, déshydraté, sous le nom commercial d'"Indubiose"*.

Le mode opératoire comporte les étapes suivantes :

1. Réhydratation

Le gel est immergé pendant une nuit dans le tampon tris-glycocolle de pH 8,7 :

Tris	:	9,0	g.
Glycocolle	:	4,68	g.
Eau distillée	:	900	ml.

Le pH de ce tampon est amené à 8,7 avec de l'HCl N.

Le gel gonfle en se réhydratant pour atteindre une épaisseur de 2 mm environ. En même temps, les feuilles de cellophane de protection se détachent.

2. Migration électrophorétique

Avant utilisation, le gel est essoré entre deux feuilles de papier filtre. Il est placé sur le support de migration, en ayant soin de chasser les bulles d'air entre le support et le gel.

Avec une lame de rasoir, on découpe des fentes de 15 mm dans lesquelles on inclue un morceau de papier Whatman N° 3 (12 x 1 mm) imbibé de la solution à 5 % dans l'eau des protéides à étudier.

L'ensemble est recouvert d'une feuille de parafilm afin d'éviter l'évaporation.

Le support de migration utilisé doit être tel que les extrémités du gel trempent dans les réservoirs à tampon de la cuve, ce qui évite l'emploi des ponts de papier filtre.

* Indubiose : SEBIA - PARIS.

La migration est conduite avec le tampon tris - glyccolite de pH 8,7 :

Tris	:	1,2	g
Glyccolite	:	25	g
Eau distillée	:	900	ml.

Le pH est ajusté à 8,7 avec une solution de soude normale.

La chute de potentiel appliquée aux extrémités du gel est de 10 v/cm.

3. Coloration

Après 2h30 de migration, à la température ambiante, l'électrophorogramme est révélé. On prépare dans ce but une solution - mère de bleu de coomassie*.

Bleu de coomassie	:	2,5	g.
Méthanol	:	500	ml.
Acide acétique	:	100	ml.
Eau distillée gsp	:	1000	ml.

Le gel est immergé dans une dilution au 1/20 de cette solution - mère avec une solution à 40 % de méthanol, contenant 5 % d'acide acétique et 2,5 % de glycérol.

La coloration dure trois heures.

La décoloration est faite par lavage de la plaque dans une solution à 20 % de méthanol contenant 5 % d'acide acétique et 3 % de glycérol.

Après rinçage à l'eau distillée, le gel est séché entre deux feuilles de cellophane, préalablement trempées dans une solution de glycérol à 3 % dans l'eau sur plaque de verre, à la température ambiante.

La révélation peut être faite avec d'autres colorants : amidoschwartz, bleu de toluidine (voir p. 136). La coloration au P.A.S. ne donne pas de très bons résultats l'agarose, substance de nature polysaccharidique fixant cette coloration.

2° - RESULTATS

a) Electrophorèse sur papier

1. Les électrophorogrammes obtenus ne permettant pas de mettre en évidence de différence d'un mélange protéique à l'autre. (Figure 18, p. 110).

2. A la suite des résultats rapportés par les auteurs, (voir p. 38), il est possible de distinguer trois zones de migration : α (livétine α), correspondant au constituant le plus rapide, β (livétine β), correspondant au constituant de mobilité électrophorétique intermédiaire, enfin γ (livétine γ), zone du composant le plus lent.

* Bleu de coomassie : Gurr 15.335.

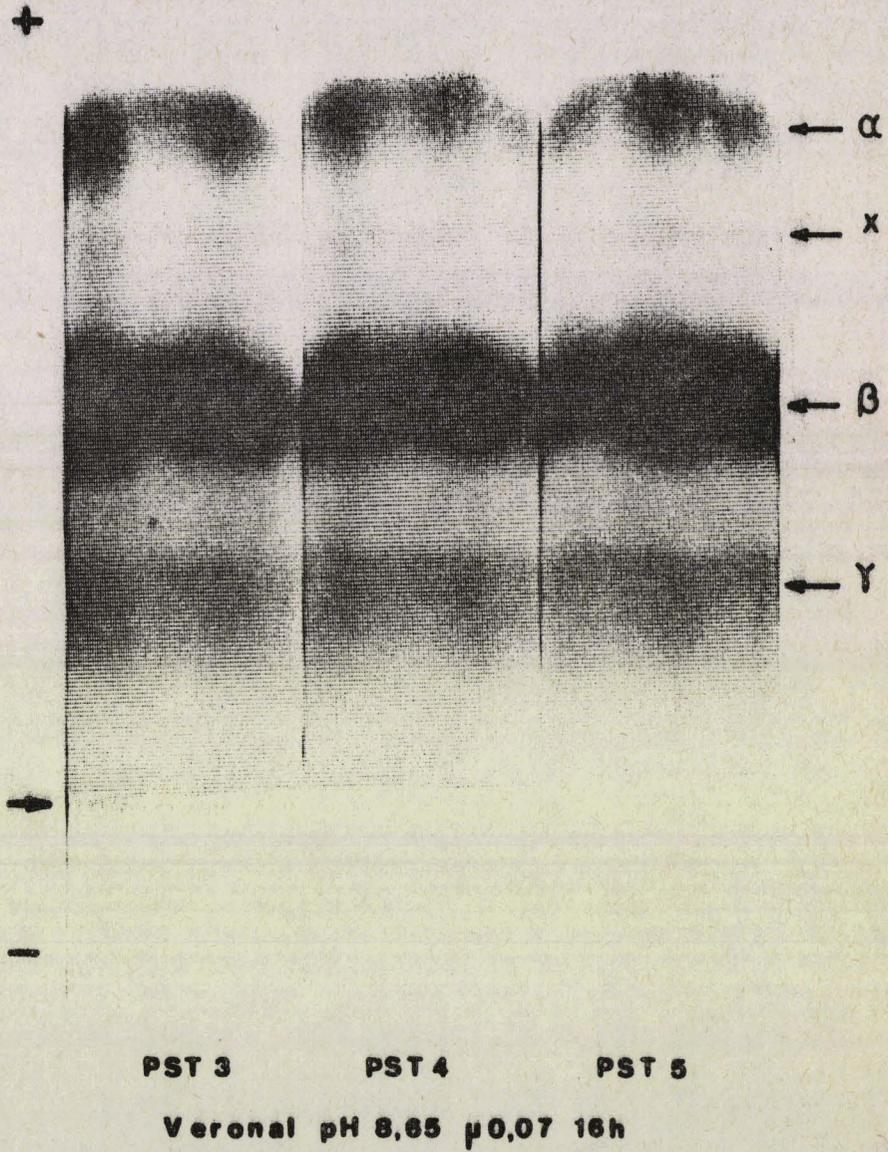


Figure 18
Electrophorèses Sur Papier des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
Préparées selon les Méthodes 3, 4 et 5
(PST - 3, PST - 4 et PST - 5)



3. Selon KNIGHT et SCHECHTMAN (1954) (442), WILLIAMS (1962) (443) et MOK et Coll (1964) (444), la zone correspondant au constituant le plus lent peut se révéler hétérogène, formée de deux bandes : γ_1 et γ_2 . Nous n'avons jamais obtenu un tel résultat, même en employant les systèmes tampons des auteurs.

Par contre, sur les électrophorogrammes que nous avons obtenus, nous observons un quatrième constituant de mobilité électrophorétique intermédiaire à celles des fractions α et β , que nous avons appelé X.

b) Electrophorèses en gelose (Figure 19, p. 112).

1. Cette technique ne permet pas de révéler de différence significative d'un mélange à l'autre.

2. Les images présentent trois zones principales : α , et β , γ , dont une zone cathodique : γ .

3. La caractérisation d'un quatrième constituant est possible : nous l'avons appelé également X, bien que l'identité des deux composants ne soit pas démontrée.

c) Electrophorèses sur acétate de cellulose (Figure 20, p. 113).

1. On retrouve avec ce support, les trois zones α , β et γ , ainsi qu'un constituant de mobilité comprise entre celles des composés α et β : X.

2. La zone β est hétérogène.

3. La zone la plus lente est hétérogène, également. On y distingue une bande γ_1 et une zone diffuse, plus lente : γ_2 .

4. Le support révèle une différence systématique entre les préparations étudiées : en effet, les images correspondantes aux PST - 4 et PST - 5 montrent une zone faiblement colorée en avant du composant α . Ce dernier ayant la vitesse de migration d'une albumine, le composé Y se comporte donc comme une préalbumine. Par ailleurs, il ne figure pas sur l'électrophorogramme du mélange PST - 3.

d) Electrophorèses en gel mixte d'acrylamide - agarose

1. Le support donne une très bonne résolution, (Figure 21, p. 114). Le découpage des électrophorogrammes en trois grandes zones : α , β et γ reste possible.

2. Les zones β et γ sont hétérogènes. Nous avons distingué, dans cette dernière, deux groupes de constituants : γ_1 , plus rapide, γ_2 de mobilité plus faible.

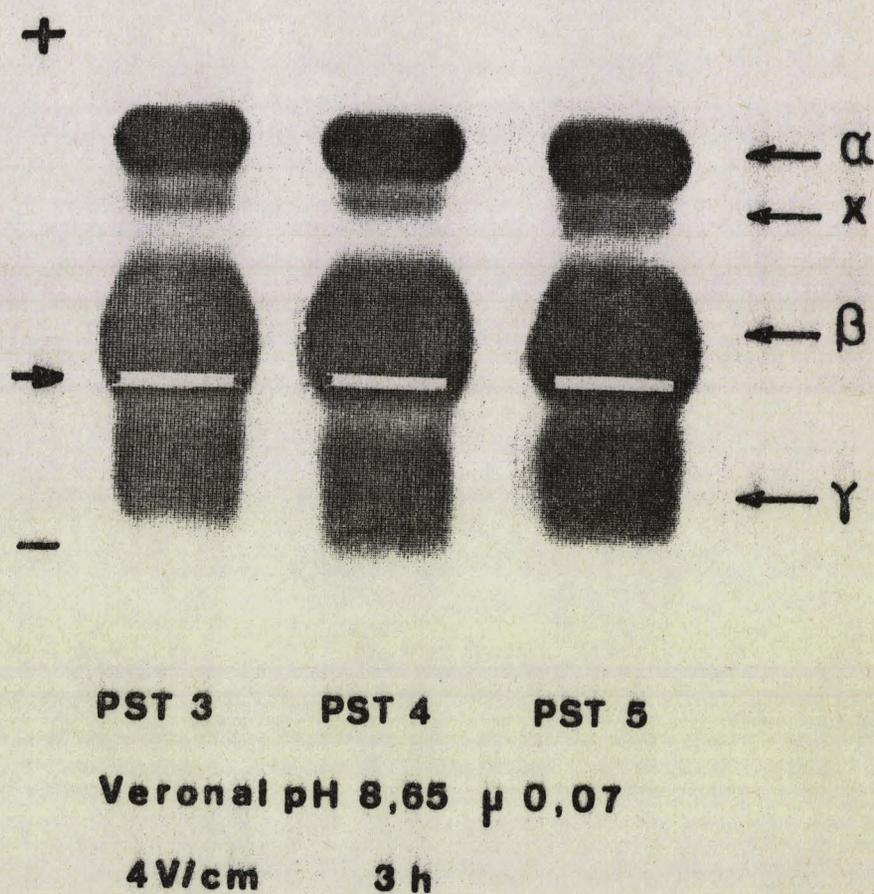


Figure 19
Electrophorèses en Gelose des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf

Préparées selon les Méthodes 3, 4 et 5

(PST - 3, PST - 4 et PST - 5)



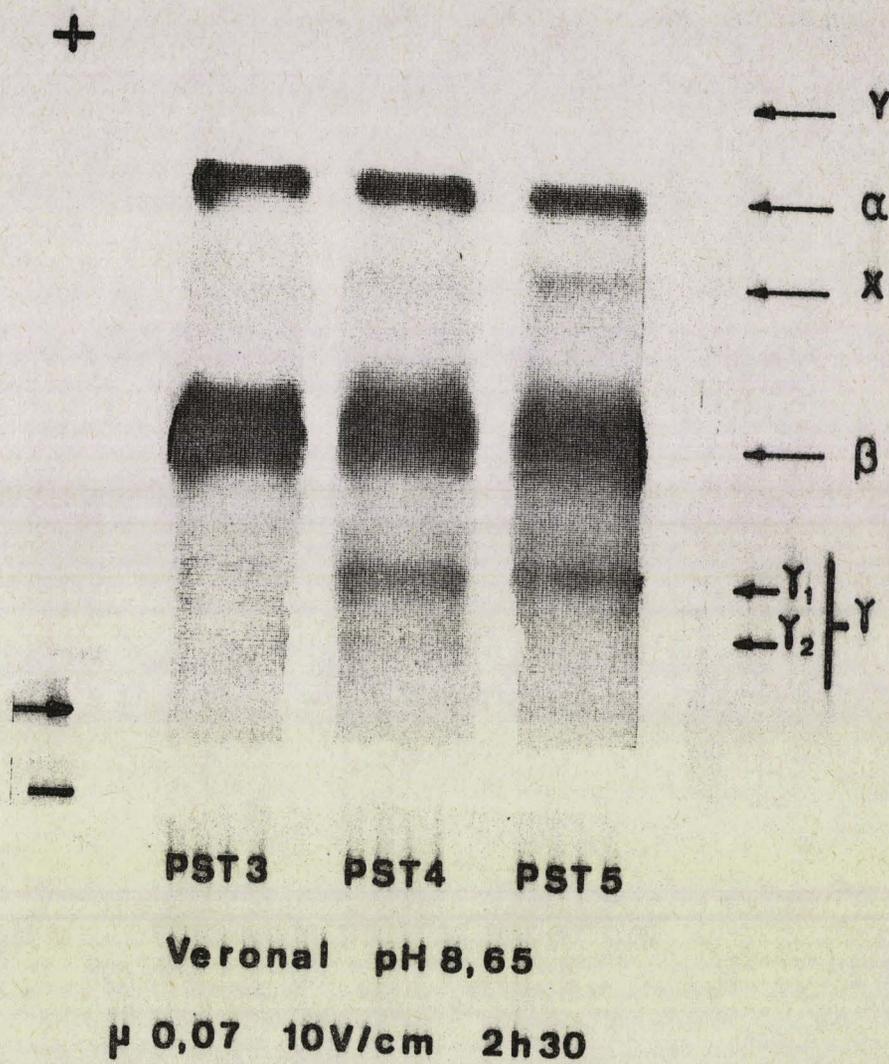


Figure 20

Electrophorèses sur Acétate de Cellulose des Protéines Solubles Totales

Du Jaune d'Oeuf Préparées selon les Méthodes 3, 4 et 5

(PST - 3, PST - 4 et PST - 5)



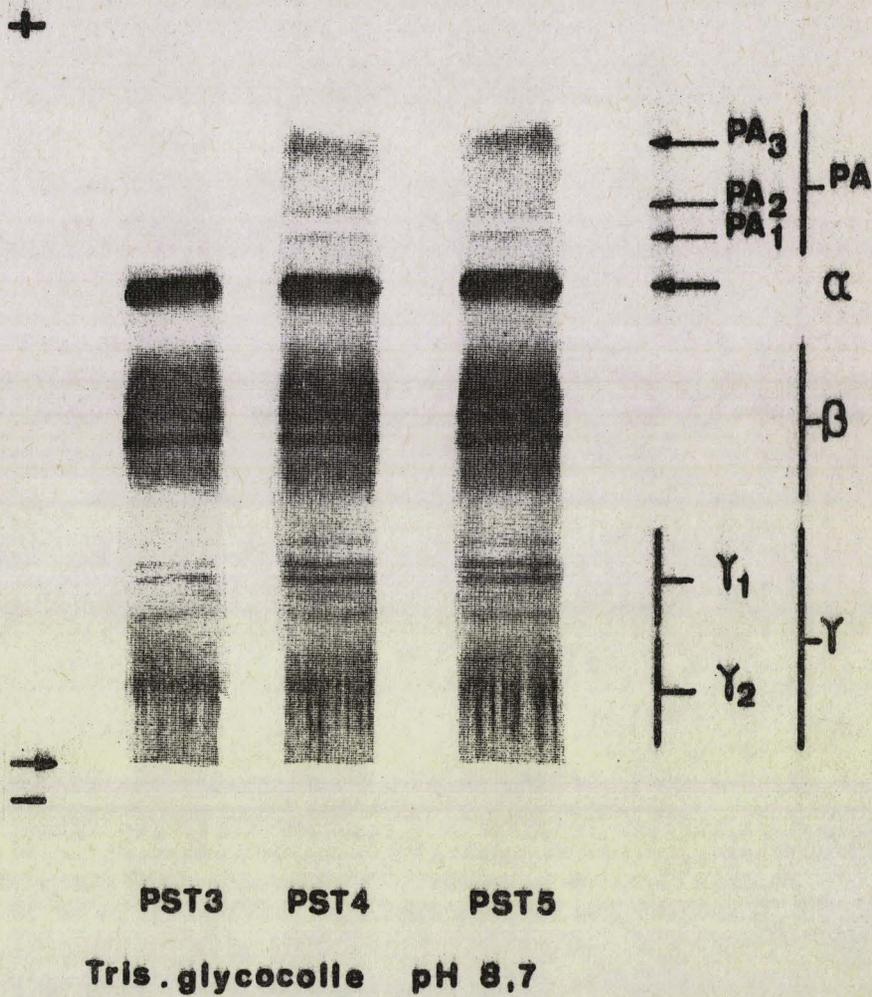


Figure 21

Electrophorèses en Gel Mixte d'Acrylamide - Agarose
 Des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
 Préparées selon les Méthodes 3, 4 et 5
 (PST - 3, PST - 4 et PST - 5)

3. Ce type d'électrophorèse est intéressant en ce qu'il permet de mieux caractériser les constituants préalbuminiques (PA), migrant en avant du composé α . Dans cette zone, les images des trois mélanges PST - 3, PST - 4 et PST - 5 sont différentes :

- Les trois électrophorégrammes présentant une bande commune : PA_1 ,
- La zone préalbuminique, (PA) des électrophorégrammes correspondant aux mélanges PST - 4 et PST - 5, est composée de trois bandes : PA_1 , PA_2 et PA_3 , les deux dernières, plus rapides, ne figurant pas sur le schéma donné par le mélange PST - 3. Notons enfin, que les images présentées par les mélanges PST - 4 et PST - 5 sont très voisines l'une de l'autre.

4. Les enregistrements densitométriques que nous avons réalisés de ces électrophorégrammes (Figure 22, 23 et 24, p. 116, 117 et 118) confirment ces résultats.

3° - CONCLUSION DE L'ETUDE ELECTROPHORETIQUE

Les électrophorèses réalisées sur les différents supports, révèlent, dans les protéines solubles totales, trois principaux composés (ou groupes de composés). A la suite, des auteurs nous les appellerons :

- Livétine α ,
- Livétine β ,
- Livétine γ .

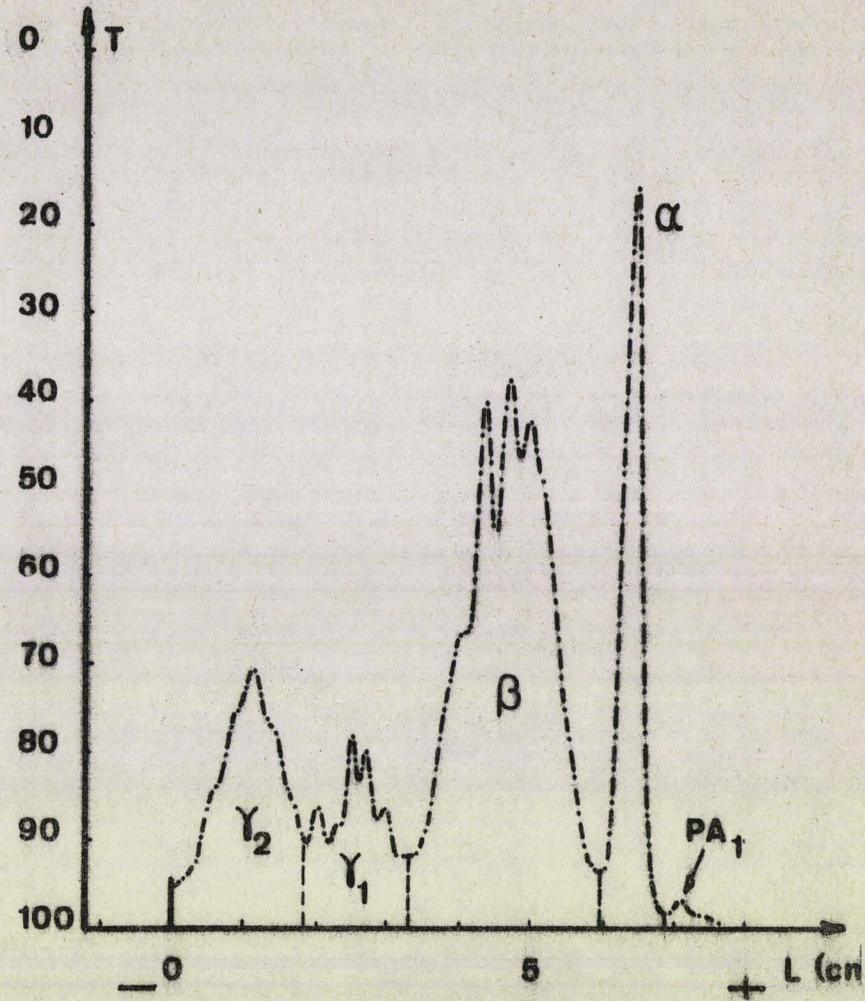
L'intégration des enregistrements densitométriques obtenus nous a conduit à déterminer les proportions relatives des composants α , β et γ dans les mélanges que nous avons préparés. Les proportions sont les suivantes :

$$\begin{aligned} \alpha &: 17,3 \%, \\ \beta &: 51,4 \%, \\ \gamma &: 31,3 \% \text{ (dont } \gamma_1 : 12 \% \text{ et } \gamma_2 : 19,3 \%). \end{aligned}$$

Ces chiffres sont à rapprocher de ceux que proposent les auteurs (voir p. 46) et paraissent en accord avec ceux de BERNARDI (1960) (445), et COOK (1962) (446).

On peut également déduire des diagrammes obtenus que les composés préalbuminiques (PA) représentent 7 % en moyenne des mélanges PST - 4 et PST - 5.

La livétine α semble être assez homogène, sur les schémas étudiés. Par contre, les livétines β et γ sont hétérogènes. Aussi, il nous paraît bien difficile d'attribuer, avec certitude, les différentes bandes obtenues, soit à la livétine β , soit aux livétines γ_1 et γ_2 , signalées par les auteurs. C'est pourquoi nous avons préféré parler de zone de migration α , β ou γ , plutôt que de livétine α , β ou γ , termes désignant un constituant, donc trop précis. Quoiqu'il en soit, l'électrophorégramme des protéines solubles totales en gel mixte d'acrylamide - agarose pose un premier problème.



PST
3

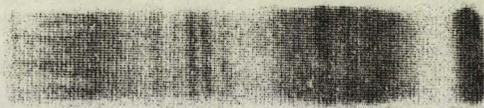


Figure 22
Enregistrement Densitométrique des
Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
Préparées selon la Méthode 3. (PST - 3)

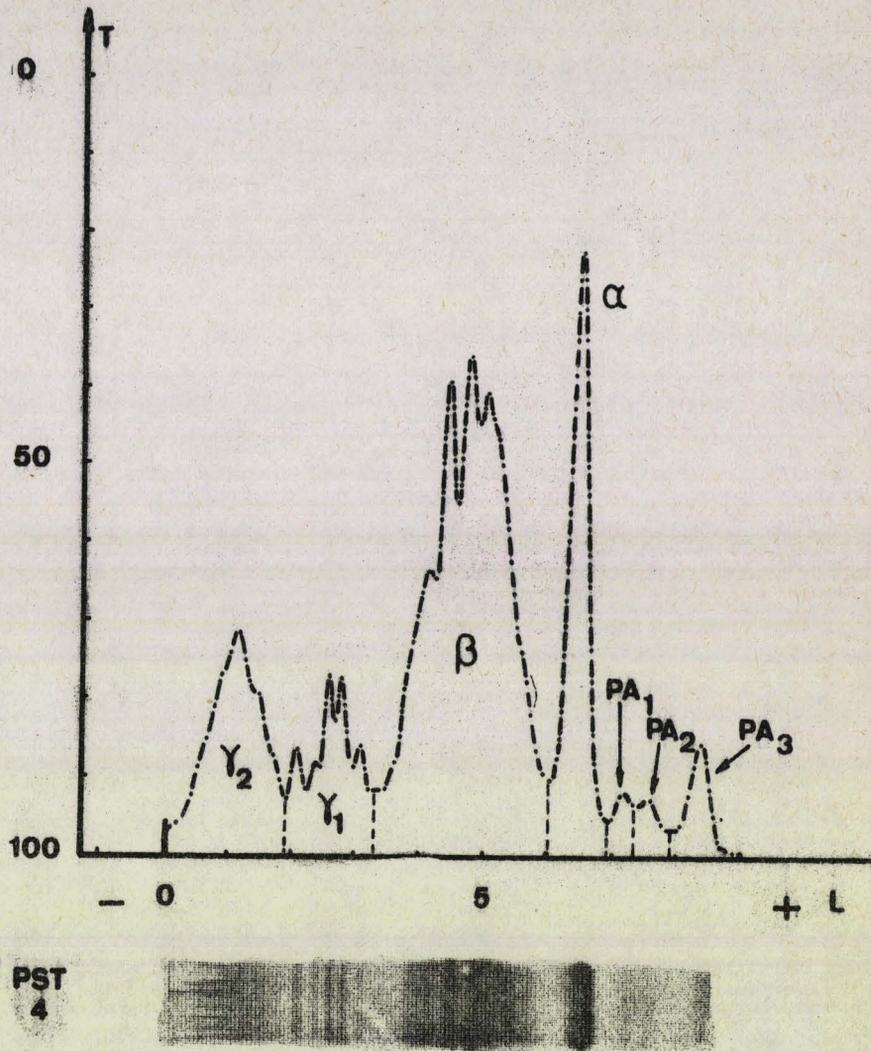


Figure 23
 Enregistrement Densitométrique des
 Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
 Préparées selon la Méthode 4 (PST - 4)

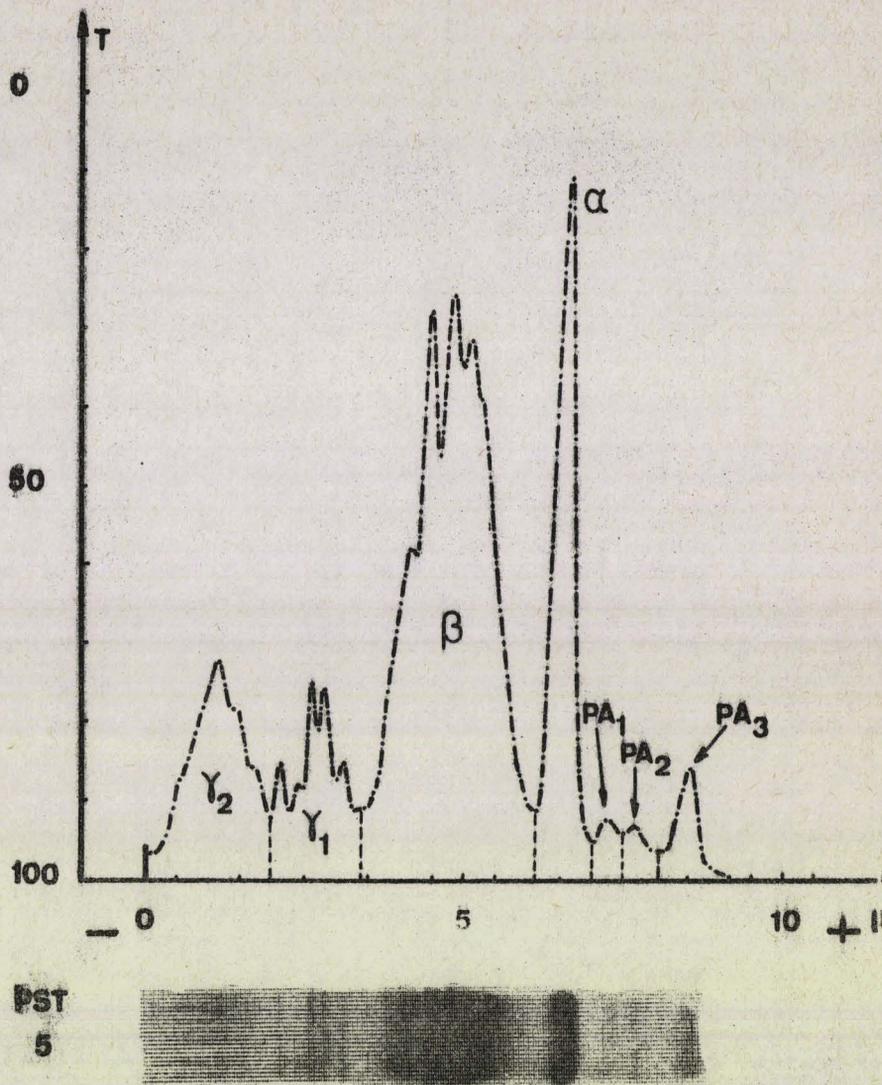


Figure 24
 Enregistrement Densitométrique Des
 Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
 Préparées selon la Méthode 5 (PST - 5)

Par ailleurs, nous avons vu que les PST - 4 et PST - 5, présentent 3 constituants préalbuminiques. L'étude bibliographique que nous avons faite, nous a appris que deux des constituants de la fraction hydrosoluble ont ce comportement :

- La phosvitine : (voir p. 58),
- La riboflavoprotéine : (voir p. 66).

La phosvitine et la riboflavoprotéine correspondent-elles à l'une ou l'autre des bandes PA₁, PA₂ et PA₃ ? C'est là un second problème, auquel nous allons apporter une réponse dans la suite de cet exposé.

B - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

Deux auteurs, WILLIAMS (1962) (447), MOK et Coll (1964) (448) ont décrit avec précision le diagramme immunoélectrophorétique qu'ils ont obtenu à partir des "livétines" (voir p. 38).

Il était donc intéressant de reprendre cette technique afin de comparer notre résultat à ceux des auteurs. Aussi, afin de nous placer dans ces mêmes conditions, nous avons étudié le mélange PST - 3, correspondant aux "livétines" étudiées par eux.

1° - MODE OPERATOIRE

a) Préparation de l'immun-sérum

Le mélange PST - 3 est mis en solution à 5 % dans de l'eau distillée. La solution est émulsionnée, à parties égales, avec de l'adjuvant de Freund complet et 1 ml du mélange obtenu est injecté à de jeunes lapins mâles, par voie intramusculaire, à raison d'une piqure par semaine. La première saignée est faite après huit injections par incision d'une veine de l'oreille. Le sang récupéré est placé à l'étuve à 37° C pendant 2 heures. Le caillot est éliminé et le sérum, après centrifugation à 1.200 t/mn pendant 30 minutes est réparti en tubes à hémolyse, congelé et stocké à - 20° C.

b) L'immunoélectrophorèse

La même gelose est utilisée pour les immunoélectrophorèses et les électrophorèses (voir p. 107). Il s'agit d'un gel d'agar - agar à 1,5 %, ionisé par un tampon véronal de pH 8,65 et de force ionique 0,07.

La migration est conduite en appliquant aux extrémités des plaques, une chute de potentiel de 3 volts/cm pendant 3h.

Après dépôt de l'immun-sérum, les plaques sont placées en chambre humide, la durée de la diffusion est de 24 heures.

2° - RESULTATS

Le diagramme obtenu (Figure 25, p. 121) révèle 9 lignes de précipitation.

Nous avons comparé notre résultat à celui des auteurs (voir p. 41 et 42), bien que les électrophorèses n'aient pas été réalisées avec les mêmes tampons :

1. D'après leur place et leur forme, de l'anode à la cathode, les arcs 1, 2, 3, 4, 8 et 9 de notre schéma sont à rapprocher des 6 arcs obtenus par WILLIAMS (1962) (449), respectivement : l'albumine (A), deux α_1 globulines, une α_2 globuline, la transferrine (T) et une γ globuline.

2. De la même façon, le parallèle est possible entre les arcs 1, 2, 4, 7, 8 et 9 et les 6 arcs de précipitation du diagramme proposé par MOK et Coll (1964) (450) notre arc 1 correspondant alors à l' α livétine, l'arc 4 à la β livétine, les arcs 8 et 9 aux γ_1 et γ_2 livétines.

Il résulte de cette comparaison que notre schéma présente quelques différences avec ceux que propose la littérature. Nous obtenons en particulier l'arc 5 mal individualisé par rapport à l'arc 4, correspondant à un constituant antigénique dont la mobilité est très voisine, toutefois légèrement inférieure à celle du constituant antigénique donnant l'arc 4. Cet arc 5, obtenu systématiquement peut d'ailleurs être plus ou moins bien individualisé selon la qualité de la résolution.

Enfin, on ne remarque pas d'arc à comportement préalbuminique, mais l'électrophorèse en gelose (voir p. 112) ne comporte pas de bande dans cette zone. Le mélange PST - 3, ne présente par ailleurs, qu'un seul constituant préalbuminique, et encore est-il révélé par l'électrophorèse en gel mixte d'acrylamide - agarose.

3° - CONCLUSION

L'immunoélectrophorèse fournit des renseignements intéressants concernant l'hétérogénéité des protéines solubles totales du jaune d'oeuf.

Le mélange PST - 3 apparaît, en particulier, plus hétérogène que ne le laissaient prévoir les résultats proposés par la littérature, puisque notre schéma permet de caractériser 9 arcs de précipitation.

Par ailleurs, le composé responsable de l'arc 5, possède une mobilité électrophorétique l'amenant au niveau de la zone β . Si la livétine β donne l'arc 4, à quel constituant l'arc 5 correspond t-il ?

Nous apporterons une réponse à cette question dans la troisième partie de cet exposé (voir p. 192).

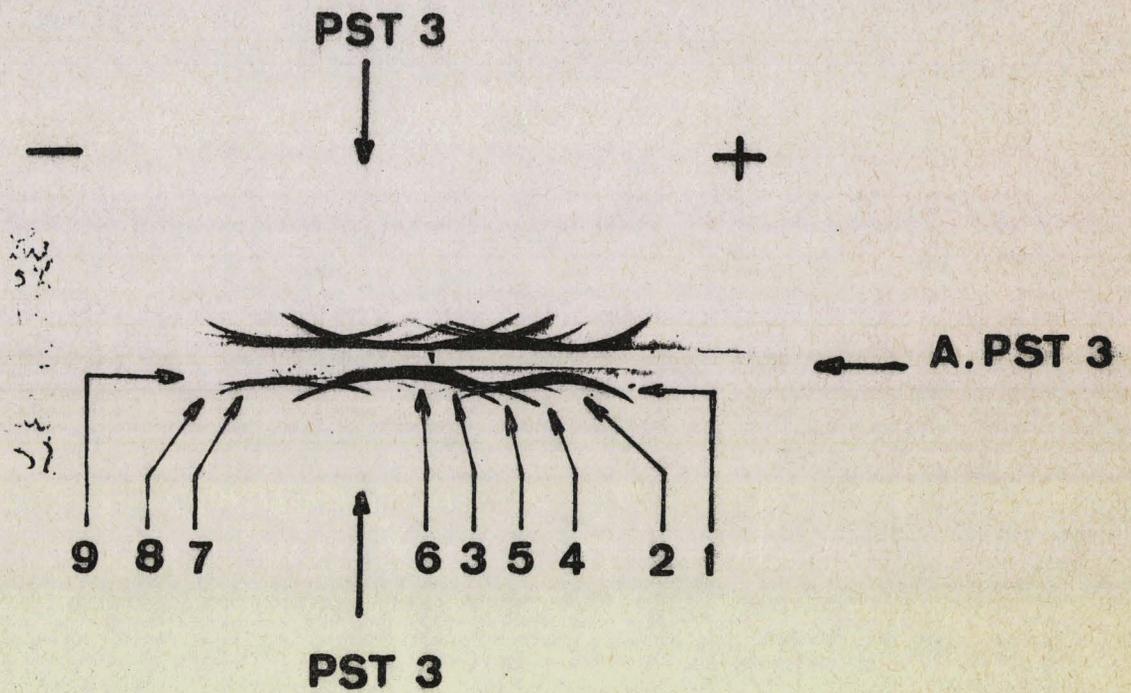


Figure 25

Immunoélectrophorèses des Protéines Solubles Totales du
Jaune d'Oeuf Préparées selon la Méthode 3 (PST - 3)

A. PST - 3 : immun-sérum Anti-Protéines Solubles Totales (PST - 3)

C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT L'ETUDE ELECTROPHORETIQUE

ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES.

L'électrophorèse en gel mixte d'acrylamide - agarose des protéines solubles totales, très résolutive pose plus de problème qu'elle n'en résoud dans l'immédiat.

Les schémas obtenus rendent très ambiguës les notions de livétines α , β et γ admises par les auteurs.

De plus, ils révèlent la présence de constituants préalbuminiques, que nous avons cherchés à identifier. Les résultats que nous avons obtenus concernant cette question sont décrits dans la deuxième partie de l'exposé de nos travaux.

L'immunoélectrophorèse, réalisée avec un immun-sérum vraisemblablement plus puissant que ceux qui ont été employés jusqu'à présent, conduit à la mise en évidence de plusieurs arcs nouveaux, dont l'arc 5. Le problème posé par cet arc est lié à celui du vitellomucoïde dont nous ferons l'étude dans la troisième partie.

2 - ETUDE DES CONSTITUANTS A COMPORTEMENT PREALBUMINIQUE

L'électrophorèse en gel d'acrylamide - agarose a permis, nous l'avons vu (voir p. 111), la mise en évidence d'un composé à comportement préalbuminique dans le mélange PST - 3 , et de trois composés dans les mélanges PST - 4 et PST - 5.

Utilisant l'électrophorèse sur papier, SEZILLE (1964) (451) et BLUM (1966) (452) ont montré, respectivement que la phosvitine et la riboflavoprotéine avaient un tel comportement, migrant en avant de l' α livétine (voir p. 58 et 66).

Le problème était donc de préparer ces constituants afin de connaître leur comportement en gel d'acrylamide - agarose, pour finalement tenter d'identifier les bandes PA₁, PA₂ et PA₃.

I - PREPARATION ET ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA

RIBOFLAVOPROTEINE.

A - PREPARATION

Nous avons utilisé deux procédés de préparation de la riboflavoprotéine. En effet, le procédé original décrit par ZAK et OSTROWSKI (1963) (453) ne nous ayant pas donné entière satisfaction, nous avons adapté au jaune, le procédé proposé par RHODES et Coll (1959) (454) à propos de la riboflavoprotéine du blanc d'oeuf.

1° - PROCEDE DE ZAK ET OSTROWSKI (1963) (455).

Le procédé décrit, dans ses grandes lignes à la page 64, comporte deux étapes principales :

a) Extraction des protéines solubles

Selon ce que nous avons dit à propos des méthodes de préparation des protéines solubles totales (p. 99), cette première étape du procédé mis au point par ZAK et OSTROWSKI (1963) (456) pour préparer la riboflavoprotéine, nous a conduit au mélange PST - 4.

b) Fractionnement des PST - 4.

La phase aqueuse obtenue, après extraction des lipides et lipoprotéines, n'est pas lyophilisée, mais fractionnée en vue d'isoler la riboflavoprotéine (RFP).

La fractionnement comporte deux phases :

1. Préparation d'une fraction enrichie en RFP:

Une fraction enrichie en riboflavoprotéine est préparée à partir de cette phase aqueuse par précipitations fractionnées, au sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu à 80 % de saturation est en effet légèrement jaune.

2. Purification de la fraction enrichie en RFP :

Le précipité obtenu, contenant la riboflavoprotéine, est soumis au fractionnement chromatographique sur DEAE - Cellulose :

. Dans un premier temps, on obtient une fraction contenant environ 60 % de riboflavoprotéine,

. Cette fraction rechromatographiée, dans un deuxième temps, conduit à la riboflavoprotéine.

D'après les auteurs, ce procédé permet la préparation de 200 mg de riboflavoprotéine pure à partir de 100 oeufs. Il est schématisé à la Figure 26 (p. 126).

2° - ADAPTATION DU PROCÉDE DE RHODES, BENNETT et FEENEY.

Dans le procédé décrit par RHODES et COLL (1959) (457), le blanc d'oeuf est soumis à un fractionnement chromatographique sur DEAE - Cellulose, dans des conditions telles que la majorité des protéides qu'il contient ne soit pas retenue sur la résine. La riboflavoprotéine est ensuite déplacée, à l'aide d'un tampon de force ionique élevée.

Nous avons imaginé d'appliquer ce procédé à une solution des protéines solubles totales du jaune, préalablement préparées.

a) Préparation des protéines solubles totales :

L'emploi du mélange PST - 4 pour obtenir la riboflavoprotéine par ce procédé paraissait s'imposer car il contient la riboflavoprotéine.

En fait le mélange PST - 5 peut être également utilisé.

Ces deux mélanges sont donc préparés en grande quantité, en vue de la seconde étape de la préparation.

b) Préparation de la riboflavoprotéine :

La préparation de la riboflavoprotéine comporte deux phases :

1. Obtention de la riboflavoprotéine brute :

Les protéines solubles totales du jaune (PST - 4 ou PST - 5) sont soumises à un fractionnement chromatographique selon RHODES et Coll (1939) (458).

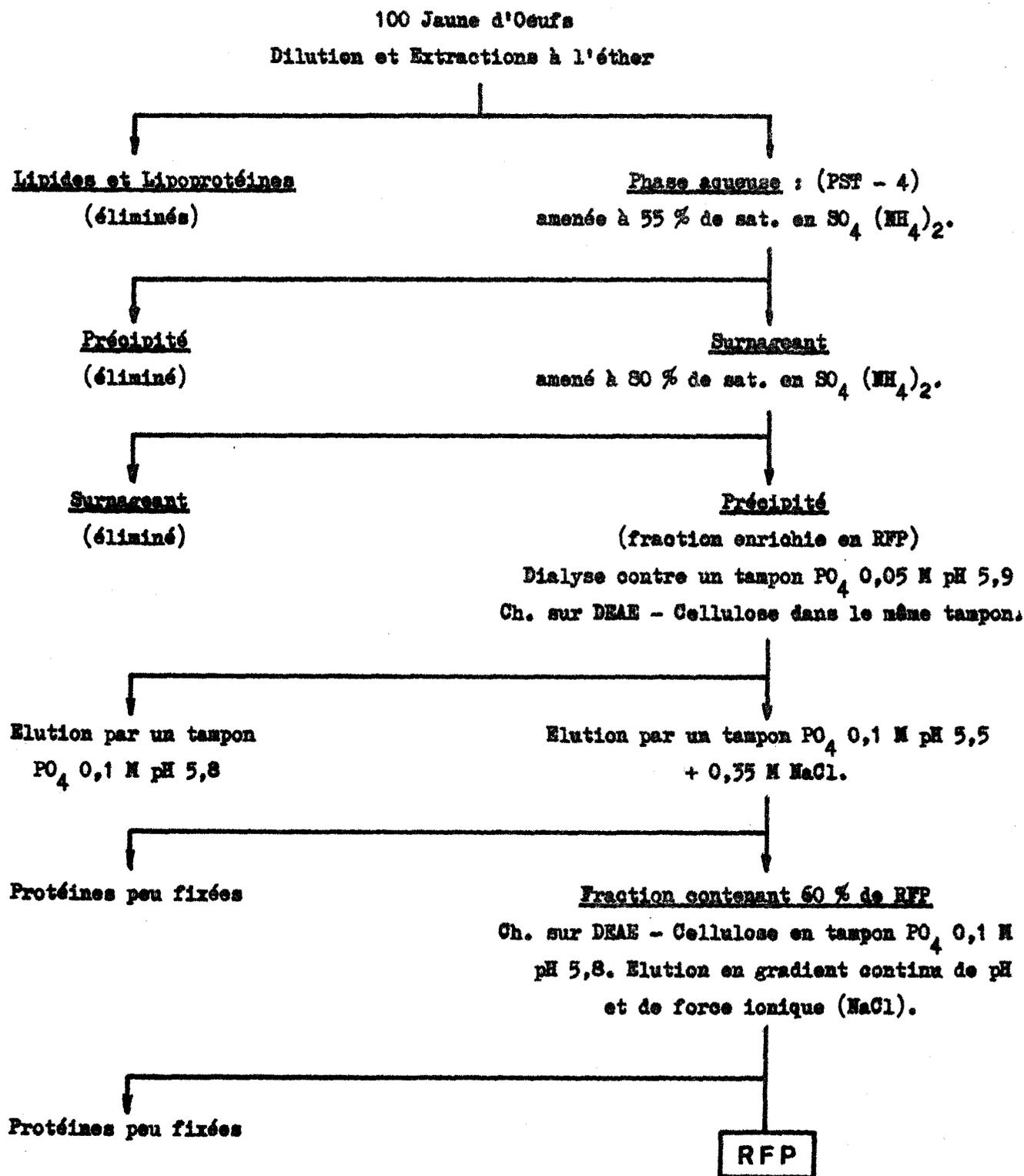


Figure 26

Préparation de la Riboflavoprotéine du Jaune d'Oeuf

Selon ZAK et OSTROWSKI (1963) (455)

Le mode opératoire est le suivant :

100 g de protéines solubles totales (PST - 4 ou PST - 5) sont mis en solution à 10% dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M , pH 4,3. La solution obtenue est passée sur une colonne (2 x 30 cm) de DEAE - Cellulose* préalablement stabilisée avec le même tampon acétate d'ammonium 0,1 M pH 4,3. La cellulose est ensuite "lavée" avec le tampon jusqu'à ce que la densité optique (à 280 nm) de la solution effluente égale 0,02. La majeure partie des protéines n'est pas retenue sur la colonne. Après le passage de ce tampon, la riboflavoprotéine fixée sur la résine, colore celle-ci en jaune. Elle est éluée par passage d'un tampon acétate d'ammonium 0,1 M pH 3,5 , molaire en NaCl. La solution effluente, intensément colorée en jaune, est dialysée et lyophilisée. On récupère ainsi, environ 800 mg de riboflavoprotéine brute.

Notons dès à présent, que la fixation de la riboflavoprotéine sur la DEAE - Cellulose peut être réalisée, "en batch". La DEAE - Cellulose est alors ajoutée en suspension dans la solution des protéines solubles totales en tampon acétate d'ammonium dans un becher, sous agitation. La cellulose modifiée est "lavée" sur Buchner avec la même solution tampon (acétate d'ammonium 0,1 M pH 4,3) puis elle est mise en colonne, "lavée" à nouveau et lorsque la densité optique de la solution effluente est suffisamment faible, la riboflavoprotéine est éluée comme précédemment.

La riboflavoprotéine brute obtenue doit être purifiée.

2. Purification de la riboflavoprotéine brute :

La riboflavoprotéine brute est purifiée par chromatographie, selon le procédé mis au point par JAKUBCZAK (1971) (459) à propos de la riboflavoprotéine du blanc.

Il s'agit d'une chromatographie sur colonne (2 x 30 cm) , de DEAE - Cellulose stabilisée en tampon phosphate 0,005 M de pH 8. L'éluion est réalisée à l'aide d'un gradient discontinu de concentration en chlorure de sodium. Les impuretés sont éluées par des concentrations en NaCl inférieures à 0,5 M , la riboflavoprotéine étant déplacée par un tampon phosphate 0,005 M de pH 8 , 0,5 M en NaCl. Après dialyse et lyophilisation, on récupère environ 600 mg de riboflavoprotéine purifiée.

L'ensemble de ce procédé de préparation est résumé à la Figure 27 (p. 128).

* DEAE - Cellulose : DE - 32 Whatman ; DANNATT - PARIS;

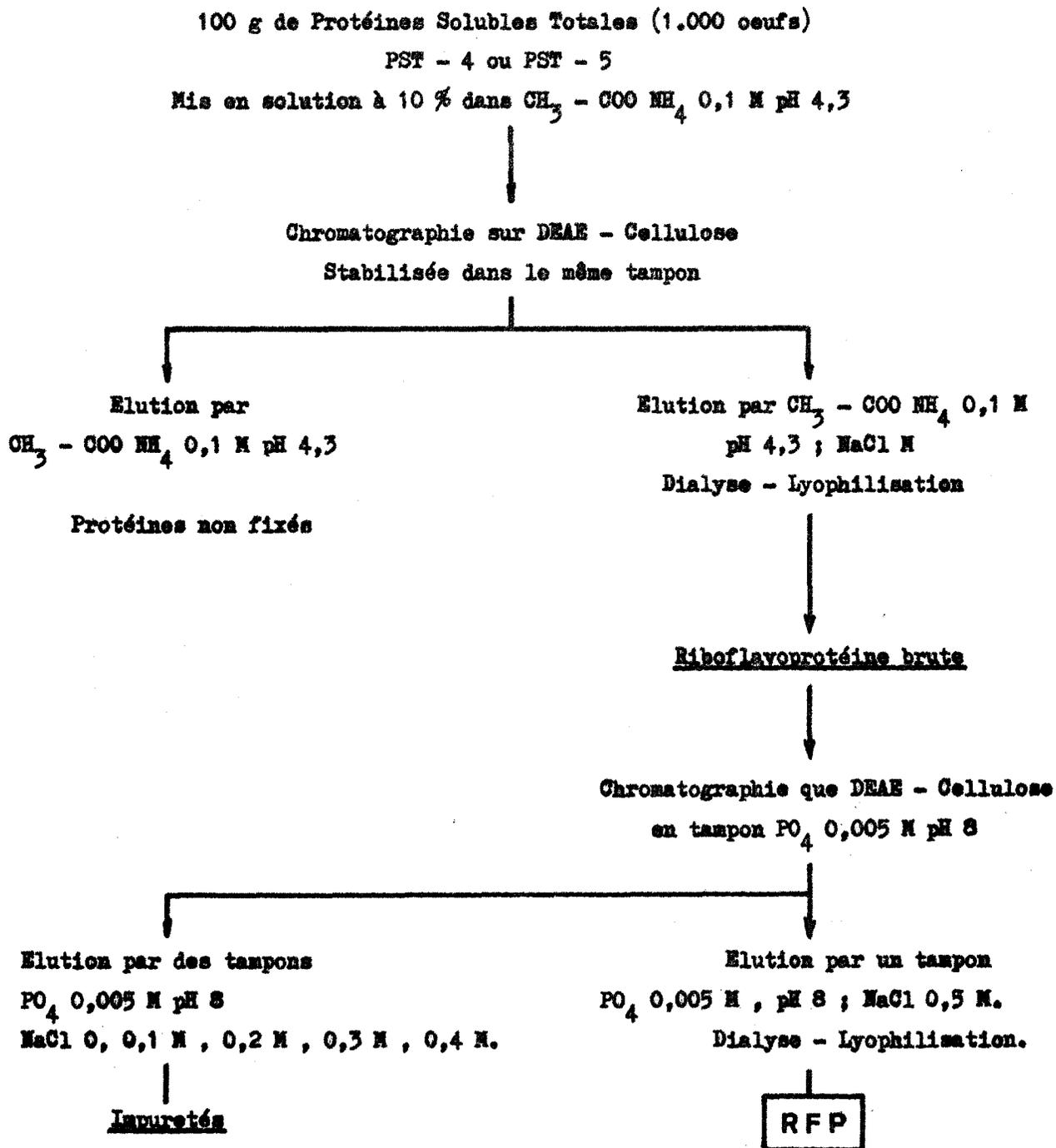


Figure 27

Schéma du Procédé Personnel de Préparation
 De la Riboflavoprotéine du Jaune d'Oeuf.

3° - CONCLUSIONS

Nous n'avons pas réussi à obtenir le rendement proposé par ZAK et Coll (1963) (460) pour la préparation de la riboflavoprotéine. D'autre part, le constituant que nous avons préparé est dans un moins bon état de pureté que celui des auteurs.

La préparation d'une grande quantité de riboflavoprotéine, par ce procédé, suppose la mise en oeuvre d'un grand volume de jaune, au départ, ce qui pose des problèmes lors de l'extraction des constituants lipidiques, puis lors du fractionnement au sulfate d'ammonium.

La lyophilisation de la phase aqueuse, obtenue après extraction des lipides selon notre procédé, résoud ce problème.

En effet, notre préparation de riboflavoprotéine est réalisée sur 100 g de protéines solubles totales, ce qui correspond à 1.000 oeufs environ, le traitement d'une telle quantité d'oeufs par le procédé de ZAK étant rigoureusement impossible sans équipement spécialisé.

B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE

1° - ELECTROPHORESES EN GELOSE

Les conditions d'utilisation de ce support ont été décrites à propos des protéines solubles totales (p. 107). Appliquée à la riboflavoprotéine, cette technique montre que le composé que nous avons préparé migre en avant de la zone α du témoin. (voir Figure 28, p. 130).

2° - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE

Ce type d'électrophorèse nous a permis de mettre en évidence, dans les mélanges PST - 4 et PST - 5 une zone à comportement préalbuminique que nous avons appelée Y (voir p. 113).

L'électrophorégramme de la riboflavoprotéine, réalisé parallèlement à ceux des mélanges PST - 4 et PST - 5, Figure 29 (p. 130) nous montre que ce composé possède une mobilité électrophorétique supérieure à celle de la zone α , l'amenant par ailleurs, au niveau du composé Y. Enfin, l'image correspondante à la riboflavoprotéine révèle également que le composé que nous avons obtenu est hétérogène.

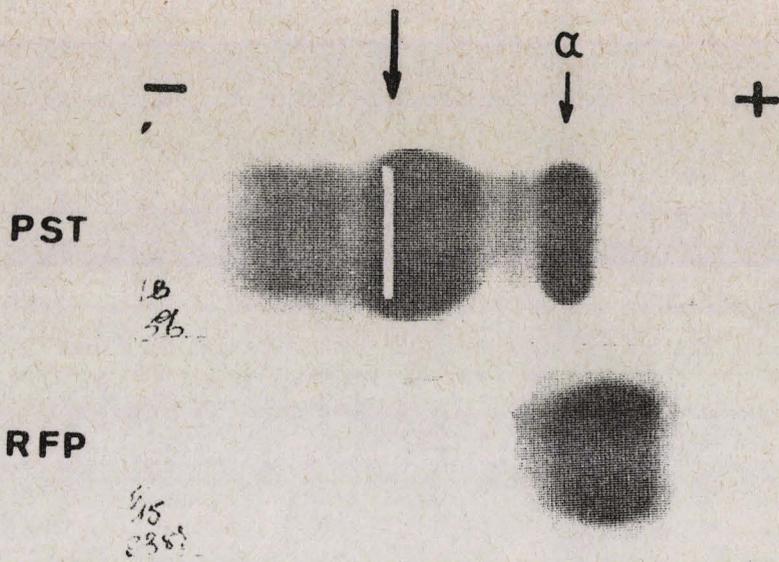


Figure 28

Electrophorèse en Gelose de La Riboflavoprotéine (RFP) du Jaune d'Oeuf

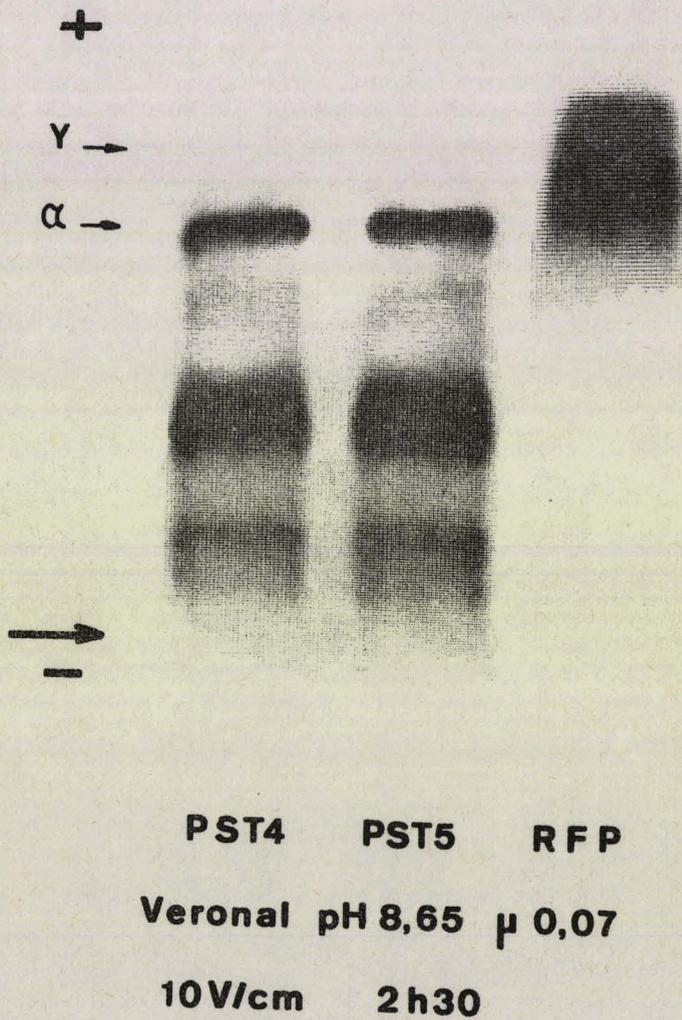


Figure 29

Electrophorèse sur Acétate de Cellulose de la Riboflavoprotéine (RFP) du Jaune d'Oeuf



3° - ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE - AGAROSE

Le schéma électrophorétique correspondant à la riboflavoprotéine que nous avons préparée comporte plusieurs bandes, dont une bande majeure attribuable à la riboflavoprotéine et migrant au niveau de la bande PA₃ du témoin (PST - 4 et PST - 5) (voir Figure 30 , p. 132). Les bandes mineures sont, quant à elles, dues à des impuretés.

4° - CONCLUSIONS

La riboflavoprotéine que nous avons préparée n'est pas pure ; le procédé par lequel JAKUBCZAK (1971) (461) a obtenu la riboflavoprotéine du blanc à l'état pur, n'est donc pas applicable avec succès du jaune d'oeuf.

Les électrophorèses réalisées sur les différents supports permettent de déduire que la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf possède un comportement préalbuminique.

Enfin, conclusion intéressante, dans le cadre de notre étude, la bande PA₃ mise en évidence dans les mélanges PST - 4 et PST - 5 , par électrophorèse en gel d'acrylamide - agarose, peut être attribuée à la riboflavoprotéine.

II - PREPARATION ET ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA PHOSVITINE

A - PREPARATION

1° - PROCEDE DE MECHAM ET OLCOTT

Le procédé original mis au point par MECHAM et OLCOTT (1949) (462) pour préparer la phosvitine est décrit et schématisé dans l'étude bibliographique des constituants du jaune d'oeuf. (voir Figure 10 p. 55).

2° - MODIFICATION DU PROCEDE DE MECHAM ET OLCOTT

Nous avons complété le fractionnement du jaune d'oeuf décrit par les auteurs en soumettant le surnageant B, obtenu dans le procédé original, et que nous avons appelé S, à des extractions étherées. Le traitement à l'éther permet d'éliminer les composés présents. On obtient une phase aqueuse qui, après dialyse et lyophilisation conduit à une poudre : S , parfaitement soluble dans l'eau.

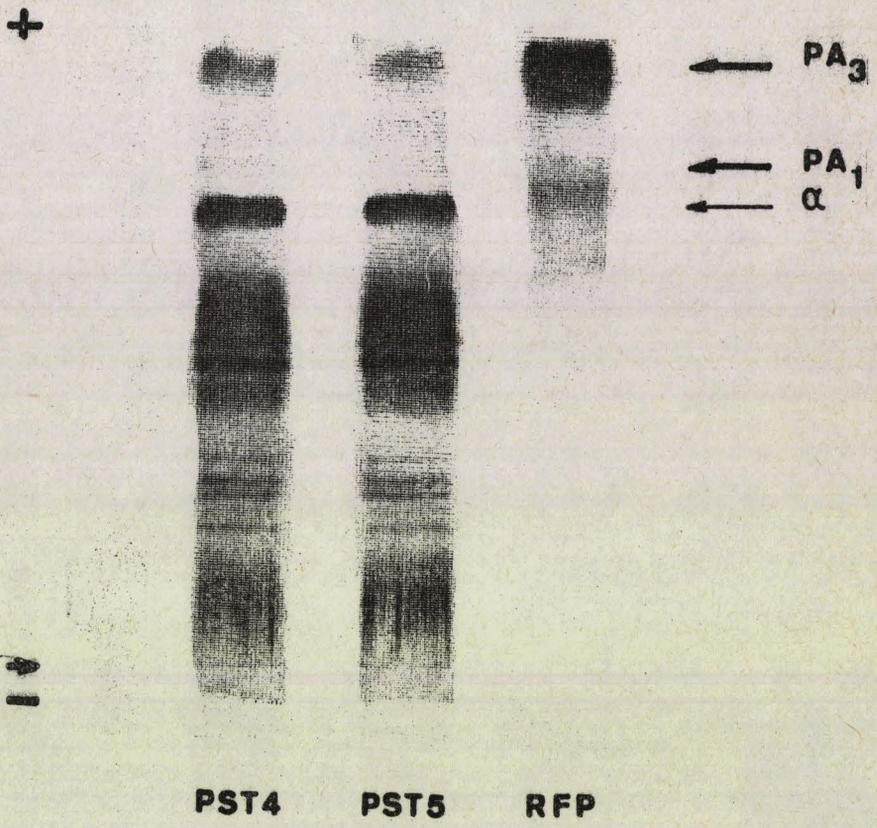


Figure 30

Electrophorèse de la Riboflavoprotéine (RFP) en Gel
d'Acrylamide - Agarose

PST - 4 et PST - 5 : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
Préparées selon les Méthodes 4 et 5



Le procédé complet de fractionnement du jaune d'oeuf, résultant de cette modification est schématisé à la Figure 31 (p. 134).

Nos fractions P, P₁, P₂ et S₂ correspondent respectivement à A, D, F et E du procédé de MECHAM et OLCOTT. Quant à la fraction C, de ce dernier procédé, elle est à rapprocher de la phase supérieure, obtenue après extraction à l'éther de notre précipité P.

3° - RESULTATS - CONCLUSIONS

Le procédé de fractionnement du jaune d'oeuf ainsi modifié et complété donne trois fractions parfaitement solubles dans l'eau : S, P₂ et S₂, P₂ étant la fraction phosvitine. Les rendements sont les suivants, à partir de 500 ml de jaune :

S	:	4,5	g,
P ₂	:	3,0	g,
S ₂	:	0,170	g,

Cette méthode de préparation de la phosvitine est rapide, et donne un bon rendement.

B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA PHOSVITINE

1° - PRINCIPES

D'après MECHAM et OLCOTT (1949) (463) la phosvitine est une phosphoprotéine très riche en phosphore (10 %).

Cette particularité fait qu'elle est difficile à révéler, sur les électrophorogrammes, par les colorants habituels des protéines : amidoschwartz, azocarmin B bleu de bromophénol (Mc CULLY et Coll - 1959) (464). Selon SEZILLE (1964) (465), la meilleure technique de mise en évidence de ce composé est la coloration au bleu alcian, colorant des mucopolysaccharides. (voir p. 58).

Notre but est d'étudier le comportement électrophorétique de la phosvitine en gel d'acrylamide - agarose. Or ces électrophorogrammes sont colorés par le bleu de coomassie, colorant qui n'a pas été utilisé par les auteurs.

Il s'agissait donc pour nous :

1. De mettre au point une technique de révélation de la phosvitine applicable au gel mixte d'acrylamide - agarose, afin de pouvoir localiser la phosvitine sur les électrophorogrammes,

2. De voir, ensuite, si la phosvitine fixe le bleu de coomassie afin d'essayer d'identifier l'une des deux bandes PA₁ ou PA₂ à ce constituant.

2° - MODES OPERATOIRES

a) Choix des techniques

Le choix des techniques que nous avons retenues pour l'étude électrophorétique de la phosvitine repose sur les observations suivantes :

1. Le bleu alcian, colorant des mucopolysaccharides permet de révéler la phosvitine (SEZILLE - 1964) (466). Nous avons essayé de révéler les électrophorogrammes en gel d'acrylamide - agarose par ce colorant. Ne disposant pas de technique spécifique à ce support, nous avons utilisé celle de CALDWELL et PIGMAN (1965) (467), mise au point à propos du gel de polyacrylamide.

Cette technique n'est pas utilisable car elle provoque une coloration du support, coloration dont l'élimination est très difficile. C'est vraisemblablement l'agarose qu'il contient qui en est responsable car cette technique donne un très bon résultat lorsqu'il s'agit de révéler les électrophorogrammes de la phosvitine, réalisés en gel de polyacrylamide (voir p. 156).

2. VAN ARKEL et Coll (1963) (468) ont décrit une technique d'électrophorèse des mucopolysaccharides en gel d'agarose. La révélation des électrophorogrammes est faite au bleu de toluidine.

3. BUCKARD, HAVEZ et DAUTREVAUX (1966) (469) ont utilisé, pour étudier les constituants de l'os compact du lapin, une technique d'électrophorèse en gel d'agarose, dans laquelle les diagrammes sont révélés par une double coloration : les glycosaminoglycanes étant colorés par le bleu de toluidine et les protéines par l'amidoschwartz. Ces techniques, appliquées dans un premier temps à la phosvitine, ont donné de bons résultats.

4. RENNERT (1967) (470), et MAURER (1971) (471) ont proposé des techniques de révélation au bleu de toluidine des mucopolysaccharides, sur des électrophorogrammes réalisés en gel de polyacrylamide.

Le bleu de toluidine, colorant utilisable pour révéler les électrophorèses conduites en gel d'agarose et de polyacrylamide devait donner également un résultat correct dans le cas des électrophorèses conduites en gel mixte d'acrylamide - agarose ; ce que nous avons vérifié dans un deuxième temps.

b) Electrophorèses en gel d'agarose

On réalise un gel d'agarose* à 2 % dans un tampon véronal de pH 8,65 et de force ionique 0,07. L'agarose est coulé sur des lames de microscope très propres à raison de 2,5 ml par lame. Après solidification, on découpe à l'emporte-pièce une fente perpendiculaire au grand axe de la lame, à 1,5 cm du bord cathodique.

Les solutions à 5 % des protéides à étudier sont déposées après mise sous tension des plaques.

La migration est effectuée en appliquant, aux bornes, une chute de potentiel de 3 volts/cm pendant 3h30.

Les lames sont ensuite fixées dans un mélange d'éthanol et d'acide acétique (93 : 7, v/v), la durée de la fixation est de 1h30.

Comme dans le cas des électrophorèses en gelose, les lames sont mises à sécher, sous papier filtre, soit à la température ambiante, soit à l'étuve à 37° C.

La révélation peut être faite par l'amidoschwartz, selon la technique classique, soit au bleu de toluidine par immersion pendant 30 minutes dans le mélange suivant :

Bleu de toluidine**	40 mg
Eau distillée	20 ml
Acétone	80 ml.

Cette solution est préconisée par VAN ARKEL et Coll (1963) (472).

Les plaques après lavage dans plusieurs bains d'une solution d'acide acétique à 1 % sont ensuite séchées. La coloration est stable.

La double coloration au bleu de toluidine et à l'amidoschwartz peut être utilisée avec succès pour mettre en évidence, sur la même plaque, la phosvitine et les protéines. Nous avons substitué le vert de lissamine à l'amidoschwartz : ainsi, sur la même plaque, les protéines ordinaires sont colorées en vert, la phosvitine en bleu-violet.

Les fixations par le Cétavlon*** et par un mélange de formol et de méthanol, selon les auteurs, ne nous ont pas donné satisfaction et nous leur préférons l'utilisation du mélange d'alcool éthylique et d'acide acétique telle que nous l'avons rapportée.

c) Electrophorèses en gel d'acrylamide - agarose

Nous avons décrit la technique d'électrophorèse à la page 108.

Après la migration, la révélation au bleu de toluidine est réalisé par immersion de la plaque dans une solution de bleu de toluidine à 0,1 % dans l'eau acidi-

* Agarose : Industrie Biologique Française - 92 - GENNEVILLIERS.

** Bleu de toluidine : MERCK - 1.273.

*** Cetavlon : Bromure de N - Cetyl - N, N, N - triméthylammonium. MERCK - 2.342.

fiée par 1 % d'acide acétique selon MAURER (1971) (473).

Le coloration dure 3 heures.

Le gel est ensuite lavé à l'aide d'une solution d'acide acétique à 0,1 %. Les étapes suivantes de vitrification du gel sont conduites selon le procédé décrit à la page 109.

3° - RESULTATS

a) Préparation de la phosvitine

Les fractions S, P₂ et S₂ (voir p. 134) obtenues au cours de la préparation de la phosvitine, ont été soumises à l'analyse électrophorétique en gel d'agarose.

Nous avons réalisé deux séries de plaques :

- L'une colorée à l'amidoschwartz, afin de révéler les protéides classiques,
- L'autre au bleu de toluidine, afin de mettre en évidence la phosvitine.

(Figure 32 , p. 138).

1. Sur l'électrophorogramme des protéines solubles totales (PST), coloré à l'amidoschwartz, (Figure 32,a) on retrouve un schéma comparable à celui que l'on obtient sur gelose (voir p. 112) . On peut caractériser les trois zones principales de migration : α , β et γ , ainsi qu'une bande correspondant à la bande X mise en évidence sur gelose. Par contre, il n'y a pas avec ce support de fraction cathodique, c'est pourquoi nous avons déplacé la fente servant au dépôt vers la cathode afin de disposer d'une zone de migration plus longue.

2. Le diagramme de la fraction S est très voisin du précédent. On peut donc assimiler S à un mélange des protéines solubles totales du jaune d'oeuf.

3. Les images des fractions P₂ et S₂ présentent une zone colorée à l'amidoschwartz ce qui prouve qu'elles contiennent des protéides fixant ce réactif.

4. Sur la série de plaques révélées au bleu de toluidine, (Figure 32, b, p. 138), on peut voir que les électrophorogrammes correspondant aux protéines totales et à la fraction S sont incolores. Les mélanges protéiques ne contiennent donc pas de phosvitine.

5. Par contre, sur la plaque réalisée avec la fraction P₂ , on observe une tache intensément colorée en bleu-violet, quant à l'électrophorogramme correspondant à S₂ , il comporte également cette tache violette témoin de la présence de phosvitine.

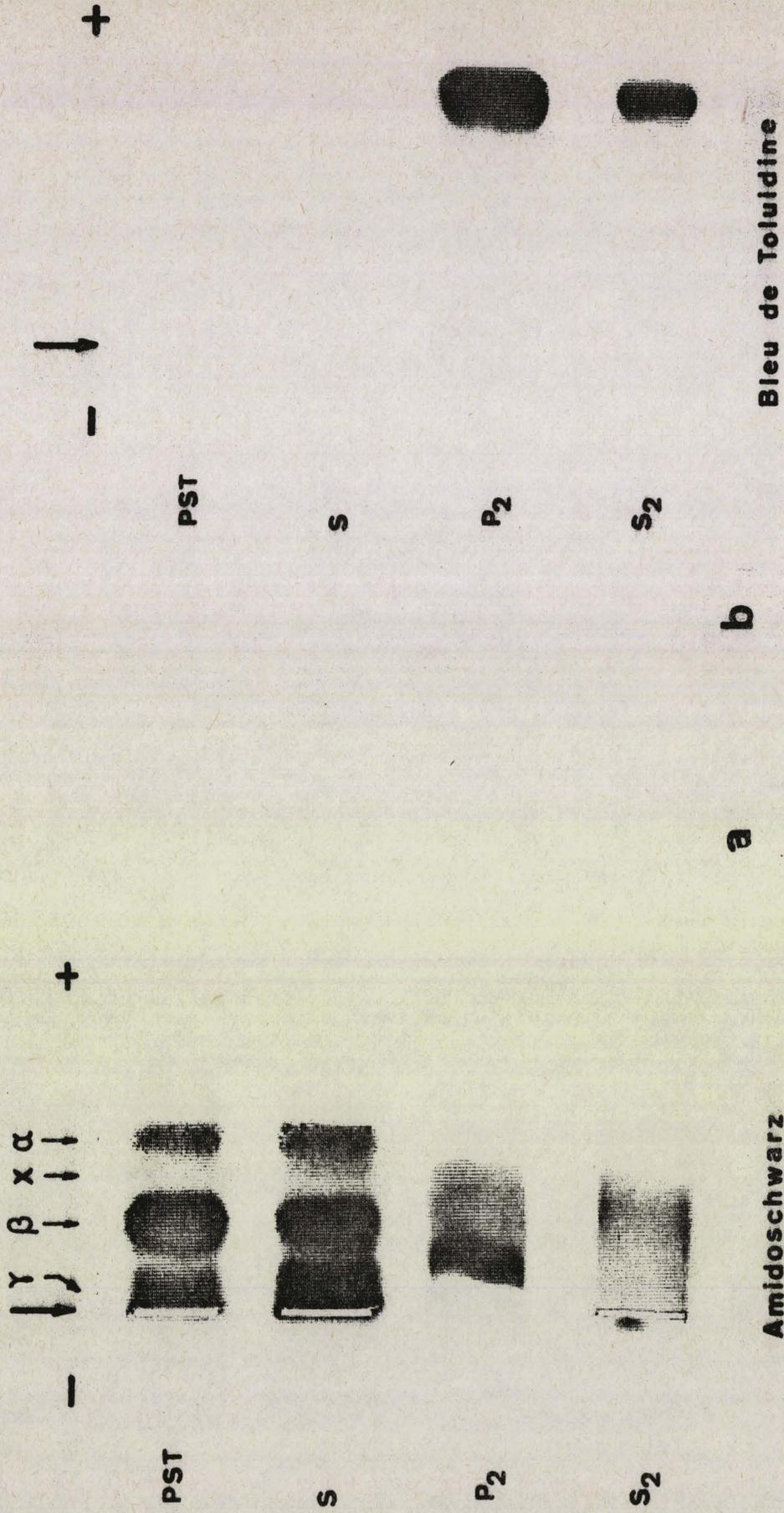


Figure 32

Préparation de la Phosvitine : Electrophorèses en Gel d'Agarose des Fractions Obtenues :

a - Coloration à l'Amidoschwarz, b - Coloration au Bleu de Toluidine.

PST : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf.



b) Etude particulière de la phosvitine

1. En gel d'agarose

La Figure 33, a (p. 140) montre les électrophorogrammes des protéines solubles totales, de la riboflavoprotéine et de la phosvitine réalisés parallèlement.

Nous avons introduit la riboflavoprotéine afin de faciliter le rapprochement avec les schémas obtenus en gel d'agar (voir p. 130). Ce dernier n'est pas utilisable car il fixe le bleu de toluidine. Cela s'explique d'ailleurs, par le caractère acide de ce polysaccharide, du aux résidus sulfates qu'il contient.

On peut constater que la phosvitine possède un comportement préalbuminique sa mobilité est supérieure à celle de la riboflavoprotéine.

A la Figure 33, b (p. 140) nous rapportons les électrophorogrammes des différents mélanges des protéines solubles totales : PST - 3, PST - 4 et PST - 5 colorés au bleu de toluidine. Les plaques obtenues sont parfaitement incolores, aucune bande n'étant révélabl par ce réactif. Les protéines solubles totales quelque soit le mélange étudié ne contiennent donc pas de phosvitine.

2. En gel d'acrylamide - agarose

Les électrophorèses de la phosvitine et des protéines solubles totales ont été conduites en gel d'acrylamide - agarose, simultanément. Après la migration, les électrophorogrammes sont révélés :

- au bleu de coomassie (Figure 34, a, p. 141) et,
- au bleu de toluidine (Figure 34, b, p. 141).

Ayant montré, en gel d'agarose, que les protéines solubles totales ne contenaient pas de phosvitine et ce, quelque soit le mélange protéique envisagé, le choix du témoin de migration importait peu.

Des diagrammes obtenus, on peut déduire que la phosvitine a une mobilité électrophorétique de préalbumine et qu'elle n'est pas colorable au bleu de coomassie.

4° - CONCLUSION

La phosvitine que nous avons préparée par le procédé de MECHAM et OLCOTT (1949) (474) n'est pas pure. La fraction obtenue est suffisamment enrichie pour permettre l'étude du comportement électrophorétique de ce constituant. Des résultats obtenus, nous pouvons déduire que la phosvitine possède une mobilité électrophorétique de préalbumine mais que les bandes PA₁ et PA₂ mises en évidence dans les différents mélanges protéiques (PST - 3, PST - 4 et PST - 5) ne sont pas identifiables à ce composé.

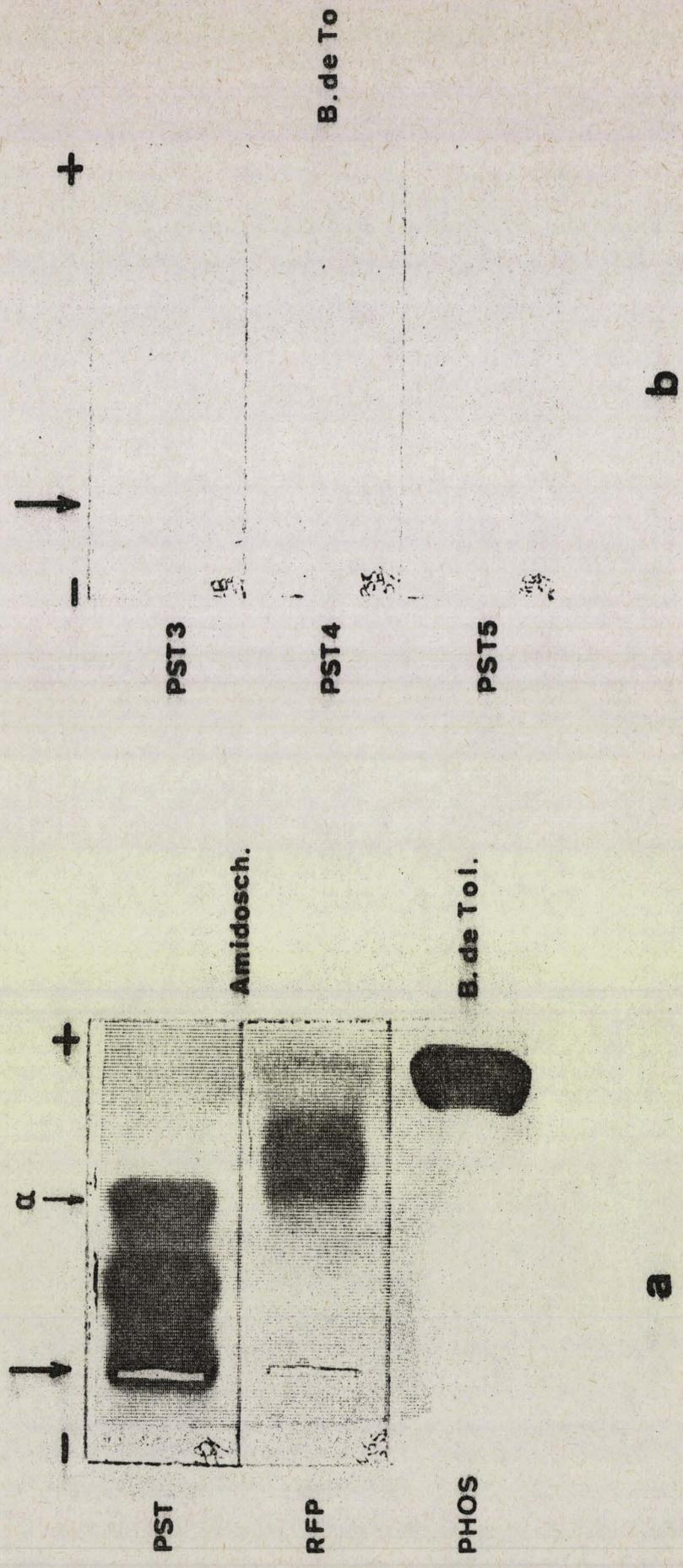


Figure 33
 Etude Particulière de la Phosvitine
 a - Electrophorèses en Gel d'Agarose des Protéines Solubles Totales (PST),
 de la Riboflavoprotéine (RFP) et de la Phosvitine (PHOS),
 b - Electrophorèses en Gel d'Agarose des Protéines Solubles Totales
 (PST - 3, PST - 4 et PST - 5) colorées au Bleu de Toluidine.

BUS
LILLE

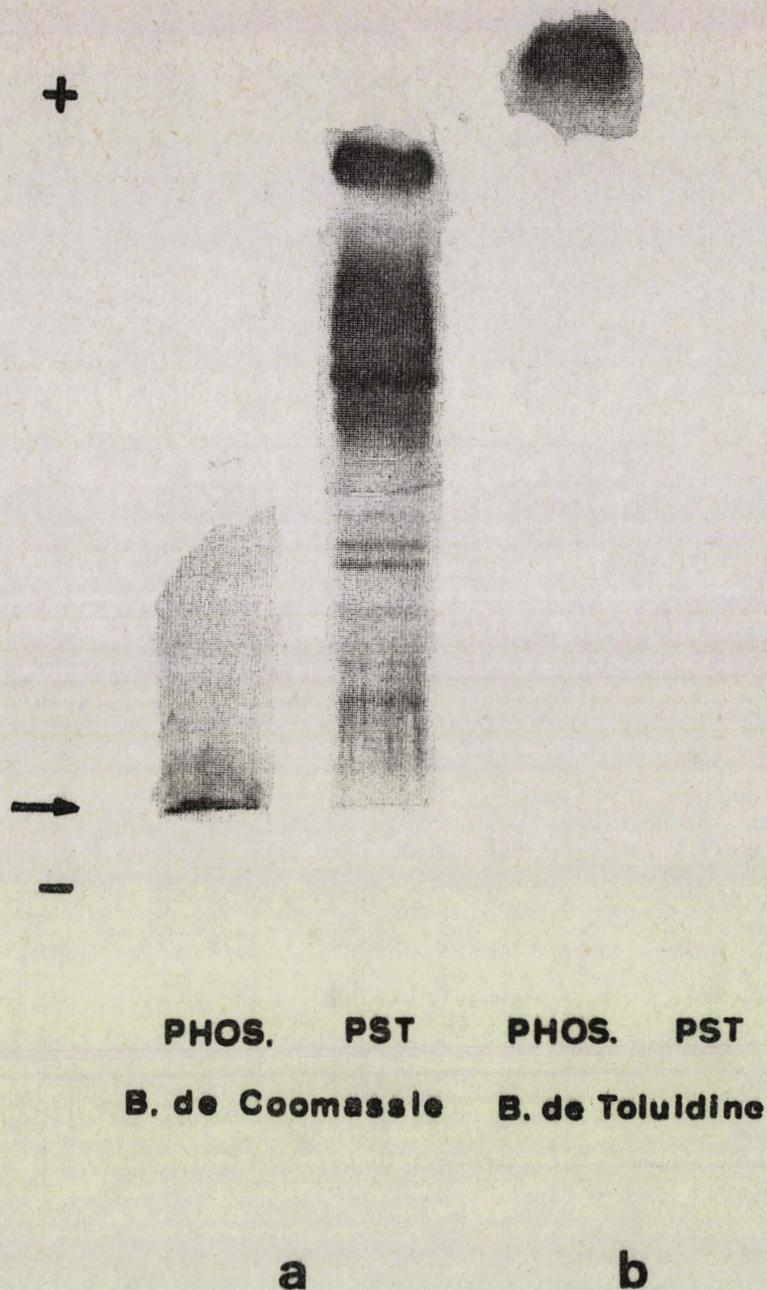


Figure 34

Etude Particulière de la Phosvitine

Electrophorèses en Gel d'Acrylamide - Agarose de la Phosvitine (PHOS) et
des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST)

a - Coloration au Bleu de Coomassie

b - Coloration au Bleu de Toluidine.



III - ISOLEMENT DU COMPOSE PA₁

L'étude de la riboflavoprotéine nous a permis d'identifier le composé PA₃. Mais le problème des bandes PA₁ et PA₂ reste posé.

Tout d'abord, nous avons envisagé le composé PA₁ et, pour tenter de l'isoler, nous avons fractionné le mélange PST - 3, qui ne contient que lui dans la zone des préalbumines.

A - PREPARATION ET ETUDE D'UNE FRACTION A₁

1° - PRINCIPE

Ce composé possède un comportement anodique sur les électrophorogrammes. Il s'agit donc, vraisemblablement d'un composé acide. De ce fait, il devrait être bien fixé sur un échangeur d'anions et au contraire peu, voire pas fixé, sur un échangeur de cations. Ce dernier type d'échangeur d'ions nous a permis d'aboutir à un résultat valable.

A la suite de RAPPAPORT et LEONIS (1962) (475), nous avons essayé de fractionner les protéines solubles totales du jaune d'oeuf sur des colonnes de CM - Cellulose* éluées à l'aide d'un gradient de pH et de force ionique. Un procédé comparable à celui que RHODES, AZARI et FENEY (1958) (476) ont mis au point, pour fractionner le blanc d'oeuf, nous a donné un meilleur résultat.

2° - MODE OPERATOIRE

10 g des protéines solubles totales du jaune (PST - 3) sont dissous dans 100 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M en acétate de pH 4,0 et soumis à la chromatographie sur des colonnes (3 x 40 cm) de CM - Cellulose stabilisée avec la solution tamponnée précédente. L'éluion des constituants est réalisée par passage du tampon de stabilisation de la résine et d'un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 4,0 molaire en NaCl, dans le but de déplacer l'ensemble des protéides fixés sur la colonne la fraction intéressante n'étant pas fixée et éluee de ce fait par le premier tampon.

* CM - Cellulose : Carboxy - méthyl - cellulose (CM 32 . Whatman - DANNATT - PARIS).

Après regroupement, les fractions sont dialysées et lyophilisées : les protéides récupérés sont soumis aux analyses chimiques (composition en glucides) électrophorétique et immunoélectrophorétique.

3° - RESULTATS

Le diagramme chromatographique correspondant à ce fractionnement est présenté à la Figure 35 (p. 144).

Le dosage d'acide sialique permet de regrouper les solutions effluentes en une fraction A₁. Outre A₁, la chromatographie donne deux autres fractions : A₂ et B.

Les rendements sont les suivants :

A ₁	:	220	mg,
A ₂	:	130	mg,
B	:	7,8	g.

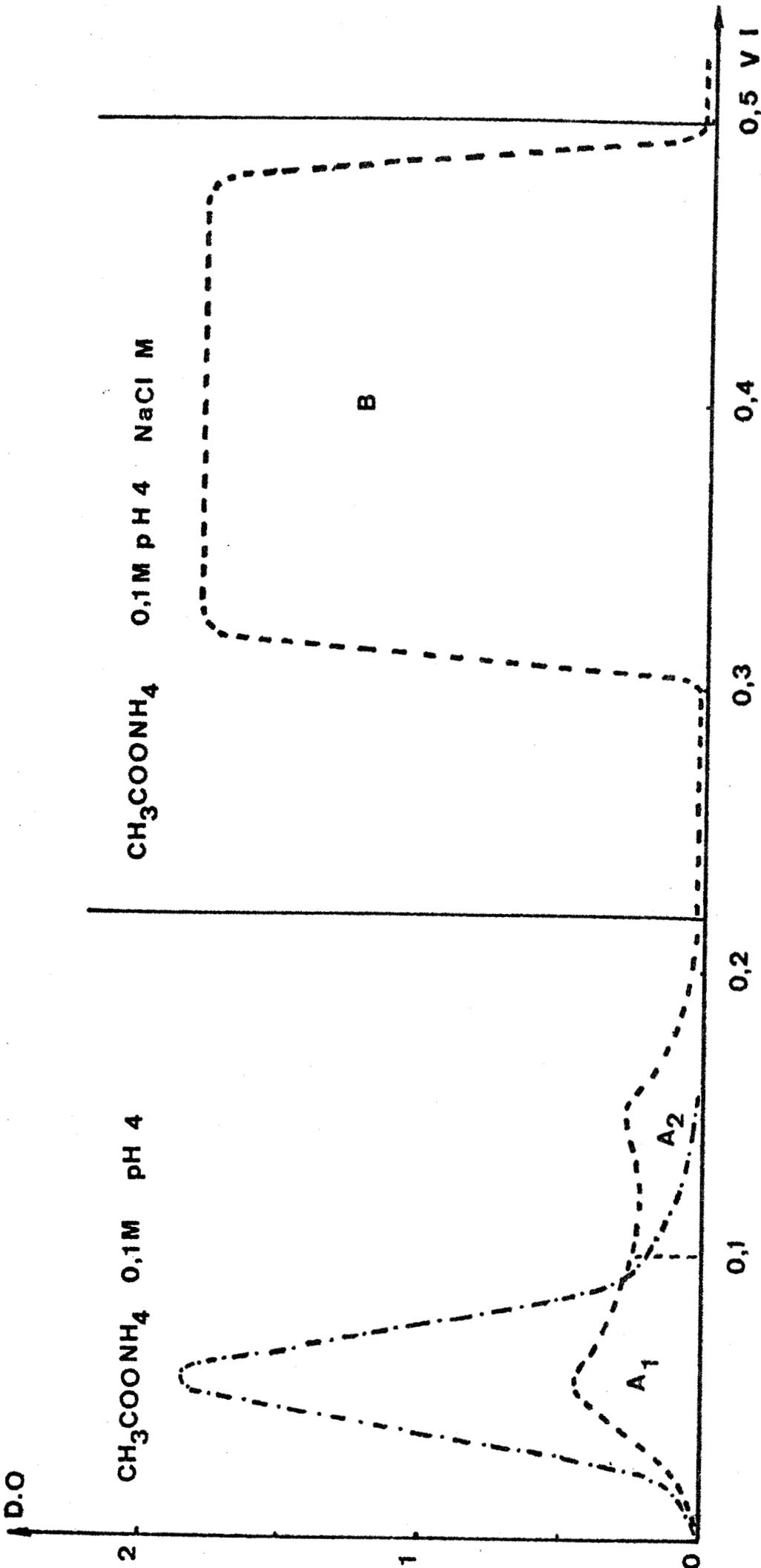
Cela représente une récupération de 81,5 % des protéides déposés sur la colonne.

Le microdosage des glucides effectué sur la poudre correspondant à la fraction A₁ fournit les résultats suivants :

Oses "neutres"	:	27	%,
Osamines	:	13,2	%,
Acides Sialiques	:	15,1	%,
Oses "neutres"	:	2,05	
<hr/>			
Osamines			
Oses "neutres"	:	1,79.	
<hr/>			
Acide Sialique			

L'étude électrophorétique de cette fraction, très riche en glucides, pose des problèmes : en effet, l'acétate de cellulose s'est révélé impropre, le composé correspondant à la fraction A₁ étant soluble dans les colorants et fixateurs utilisables. L'agar-agar nous a fourni de meilleurs résultats car il permet l'emploi de fixateurs efficaces. Nous avons utilisé un mélange d'alcool et d'acide acétique (9 : 1 : v/v). Après fixation, les électrophorogrammes ont été révélés à l'amidoschwartz et par la coloration au P.A.S. La Figure 36 (p. 145) montre les schémas obtenus.

On peut en conclure que la fraction A₁ est P.A.S. positive et présente un diagramme composé d'une seule bande, ayant la mobilité d'une α_1 globuline.



BUS
LILLE

Figure 35

Chromatographie des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST - 3)
 sur CM - Cellulose : Diagramme d'Elution

- - - - : Protéines:280 nm ;
 - . - . - . : Acide Sialique : 530 nm.

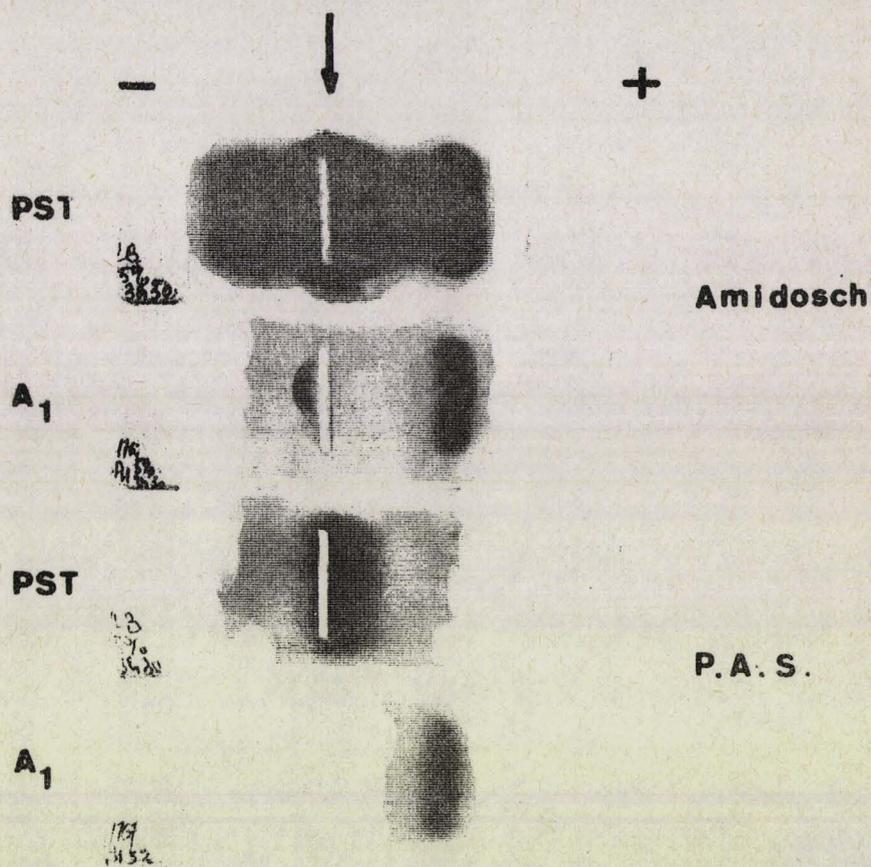


Figure 36

Electrophorèse en Gelose de la Fraction A₁
 Obtenue par Chromatographie sur CM - Cellulose
 Des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST)
 Coloration à l'Amidoschwartz et au P.A.S.

Etudiée par l'électrophorèse en gel d'acrylamide - agarose, elle donne une image intéressante comportant un constituant majeur, au niveau de la bande PA₁ du témoin. L'électrophorégramme présente en outre une zone faiblement colorée de mobilité électrophorétique inférieure (Figure 37, p. 147).

Le composé PA₁ contenu dans la fraction A₁ n'est pas pur. Il fixe relativement mal la coloration par le bleu de coomassie, ce que nous attribuons à sa richesse en glucides. La révélation au P.A.S., appliquée à ce support, ne donne pas un bon résultat, car l'agarose qu'il contient fixe cette coloration.

L'immunoélectrophorèse, appliquée directement, avec le sérum antiprotéines solubles totales, dont nous disposons, ne donne pas d'arc et cela à aucune des concentrations essayées entre 0,1 et 10 % (Figure 38, p. 148). Notre immun-sérum ne contient donc pas l'anticorps correspondant au constituant PA₁; cela peut être du au fait que, ce composé est présent en faible quantité dans le mélange des protéines solubles totales. On peut également penser qu'étant donnée sa richesse en glucides PA₁ est faiblement antigénique.

Nous avons ainsi été amenés à préparer un immun-sérum spécifique de la fraction A₁, en l'injectant à des lapins selon notre technique (voir p. 119).

Le diagramme immunoélectrophorétique obtenu, avec cet immun-sérum (AA₁) Figure 38 (p. 148) présente deux arcs très nets, l'un d'eux ayant le comportement d'une α_1 , l'autre celui d'une α_2 globuline.

Ce résultat vient confirmer celui de l'électrophorèse en gel d'acrylamide - agarose et permet de préciser que la fraction A₁ isolée sur CM - Cellulose contient deux constituants antigéniques, l'un d'eux, le constituant majeur étant PA₁.

Quant aux autres fractions, l'électrophorèse montre qu'elles sont hétérogènes. La fraction B présentant un schéma identique à celui des protéines solubles totales. Toutefois, la bande correspondant au composé PA₁ est absente des diagrammes obtenus avec le gel mixte d'acrylamide - agarose.

4° - CONCLUSIONS

La chromatographie du mélange des protéines solubles totales (PST - 3) sur carboxy - méthyl - cellulose permet de préparer une fraction A₁ de nature glycoprotéinique, riche en glucides, et contenant deux constituants antigéniques. L'un d'eux, le constituant majeur, correspond au constituant PA₁.

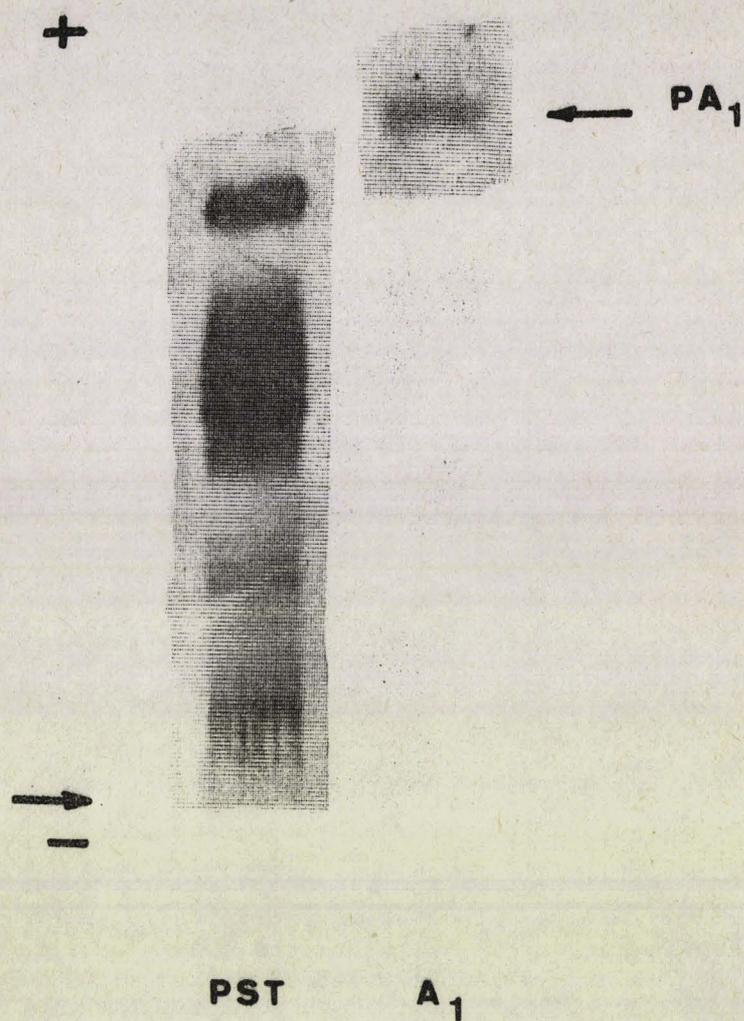


Figure 37

Electrophorèse en Gel d'Acrylamide - Agarose de la Fraction A₁
Obtenue par Chromatographie sur CM - Cellulose
des Protéines Solubles Totales (PST - 3)

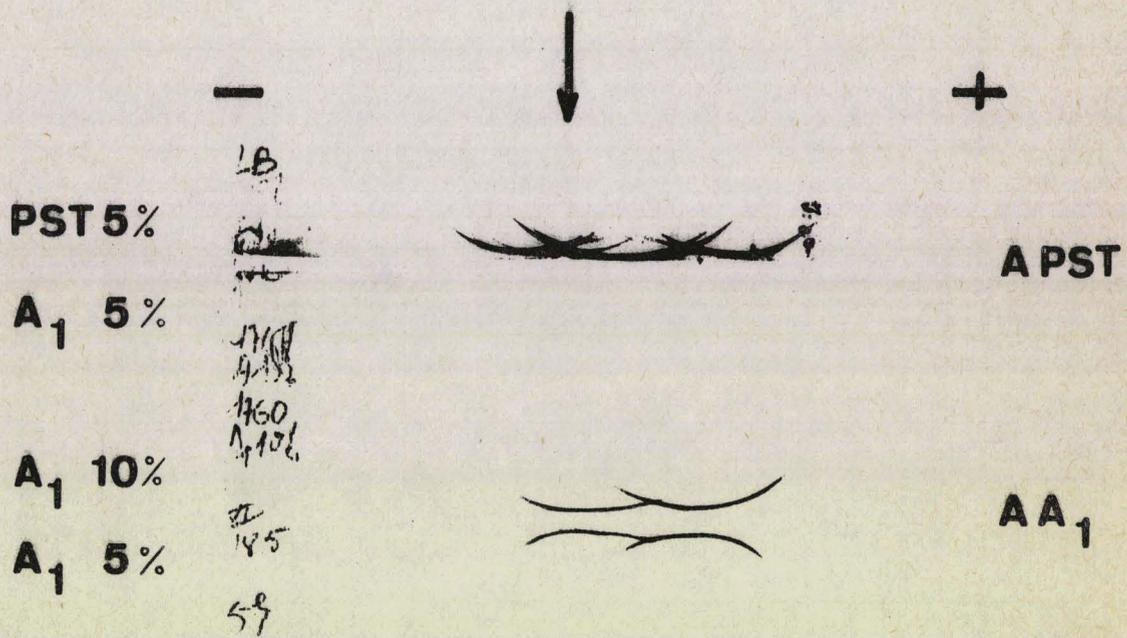


Figure 38

Immunoélectrophorèses de la Fraction A₁
 Obtenue par Chromatographie sur CM - Cellulose

Des Protéines Solubles Totales du Jaune (PST - 3)

A. PST : Immun-sérum Anti-Protéines Solubles Totales du Jaune

A. A₁ : Immun-sérum Spécifique de la Fraction A₁.



B - ESSAI DE PURIFICATION DE LA FRACTION A₁

La fraction A₁ se révèle hétérogène en immunoelectrophorèse. Cette technique, conduite avec l'immun-sérum spécifique de la fraction A₁ dont nous disposons, est en fait très sensible. En effet, l'électrophorèse en gel d'agar ne révèle la présence que d'un seul constituant, et l'électrophorèse en gel d'acrylamide - agarose montre, outre la bande correspondant au constituant PA₁, une zone légèrement colorée, de mobilité électrophorétique plus faible.

Nous avons essayé d'obtenir le constituant PA₁ dans un meilleur état de pureté, en cherchant à éliminer le constituant antigénique responsable de l'arc de précipitation en position de α_2 globuline sur nos diagrammes.

1° - MODE OPERATOIRE

600 mg des fractions A₁ de 3 chromatographies des protéines solubles totales (PST - 3), sont rechromatographiées sur une colonne de CM - Cellulose (2 x 15 cm), stabilisée dans les mêmes conditions.

2° - RESULTATS

Le diagramme d'éluion est composé d'un seul pic dissymétrique.

Les solutions effluentes, correspondant à la première partie du pic, conduisent après dialyse et lyophilisation à la fraction PA₁ dont on récupère 200 mg.

Le microdosage des glucides fournit les résultats suivants :

Oses "neutres"	:	28	%
Osamines	:	14	%
Acide Sialique	:	15,7	%
Oses "neutres"	:	2	
<hr/>			
Osamines			
Oses "neutres"	:	1,78	%
<hr/>			
Acide Sialique			

Soumise à l'électrophorèse en gel d'acrylamide - agarose, la fraction PA₁ se révèle homogène. Le schéma obtenu (Figure 39, p. 150) ne comporte qu'une seule bande au niveau du composé PA₁.

Enfin, l'immunoelectrophorèse réalisée avec l'immun-sérum anti A₁, montre que la fraction PA₁ n'est pas immunologiquement homogène. Mais l'arc en position d' α_2 globuline est atténué, en particulier lorsque la concentration de PA₁ est de 5 % (Figure 40, p. 151).

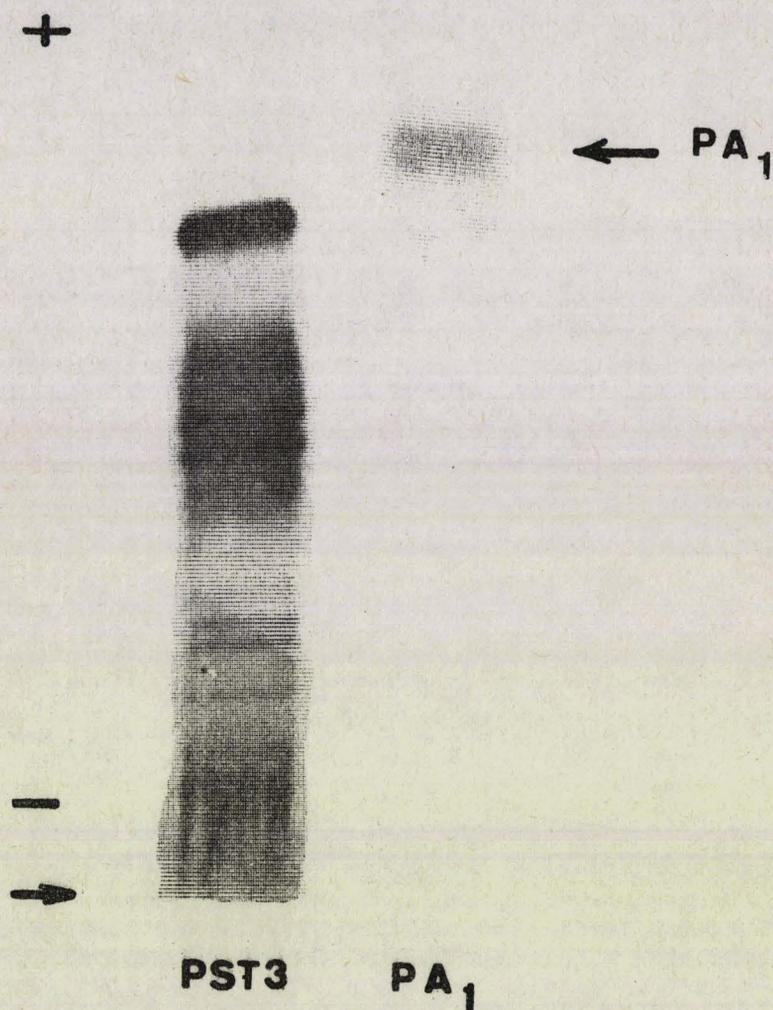


Figure 39

Electrophorèse en Gel d'Acrylamide - Agarose de la Fraction PA_1
Obtenu par Rechromatographie sur CM - Cellulose
PST - 3 : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf,
Préparées selon la Méthode 3.

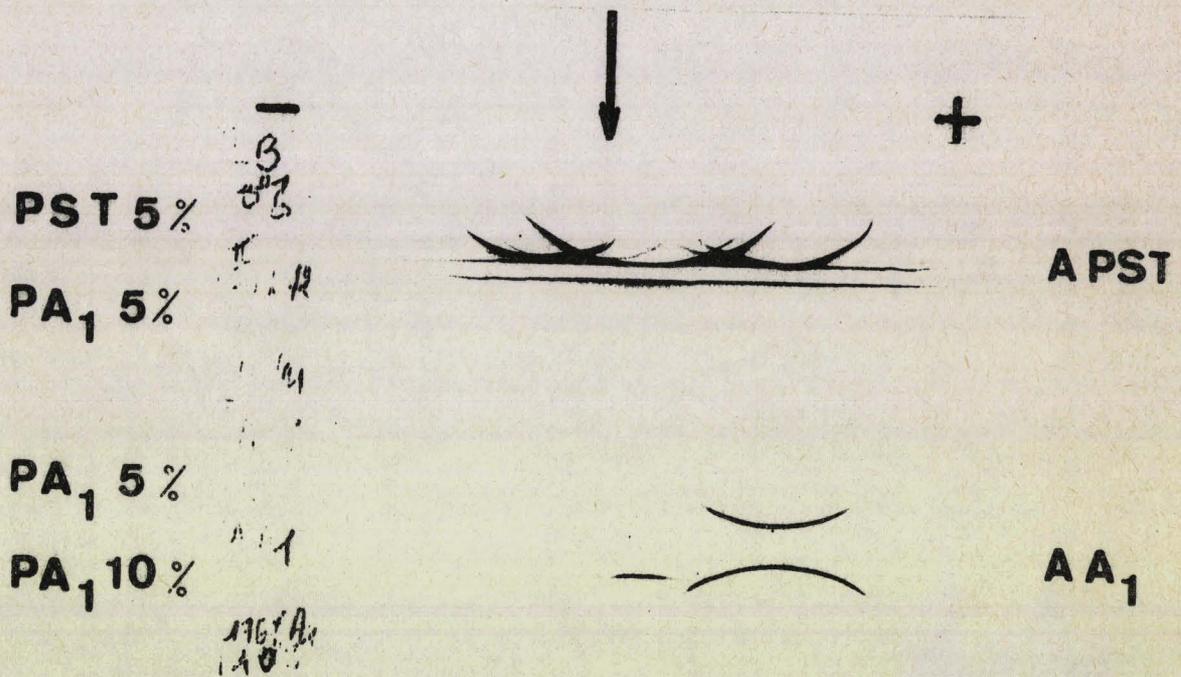


Figure 40

Immunoélectrophorèses de la Fraction PA₁
 Obtenue par Rechromatographie sur CM - Cellulose
 De la Fraction A₁

PST : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
 A. PST : Immun-sérum anti-Protéines Solubles Totales,
 A. A₁ : Immun-sérum Spécifique de la Fraction A₁.



3° - CONCLUSION

Nous n'avons pas réussi, jusqu'à présent, à obtenir une fraction PA₁ immunologiquement pure. Cependant, l'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse permettent d'affirmer que le composé en mélange avec PA₁, dans la fraction obtenue, y est en faible quantité.

C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LE COMPOSE PA₁

La chromatographie des protéines solubles totales (PST - 3) sur CM - cellulose a permis la préparation d'un constituant nouveau du jaune d'oeuf, que nous avons appelé PA₁. C'est une glycoprotéine, très riche en glucides (57,7 % de glucides totaux) présentant les caractères d'une α_1 globuline, en gel d'agar et ceux d'une préalbumine en gel d'acrylamide - agarose.

IV - PROPRIETES COMPAREES DES CONSTITUANTS A COMPORTEMENT

PREALBUMINIQUE.

A - PROPRIETES PHYSIQUES

1° - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE

a) Mode opératoire

Nous avons réalisé, parallèlement des électrophorégrammes en gel d'acrylamide - agarose des trois composés à comportement préalbuminique, que nous avons préparés : riboflavoprotéine, phosvitine et PA₁. Après la migration, la phosvitine est colorée par le bleu de toluidine tandis que les autres composés, ainsi que le témoin de migration, sont révélés au bleu de coomassie.

b) Résultat

La Figure 41 (p. 153) montre le résultat que nous avons obtenu.

c) Conclusion

Les trois composés possèdent des mobilités électrophorétiques différentes. Il s'agit là d'un premier caractère distinctif.

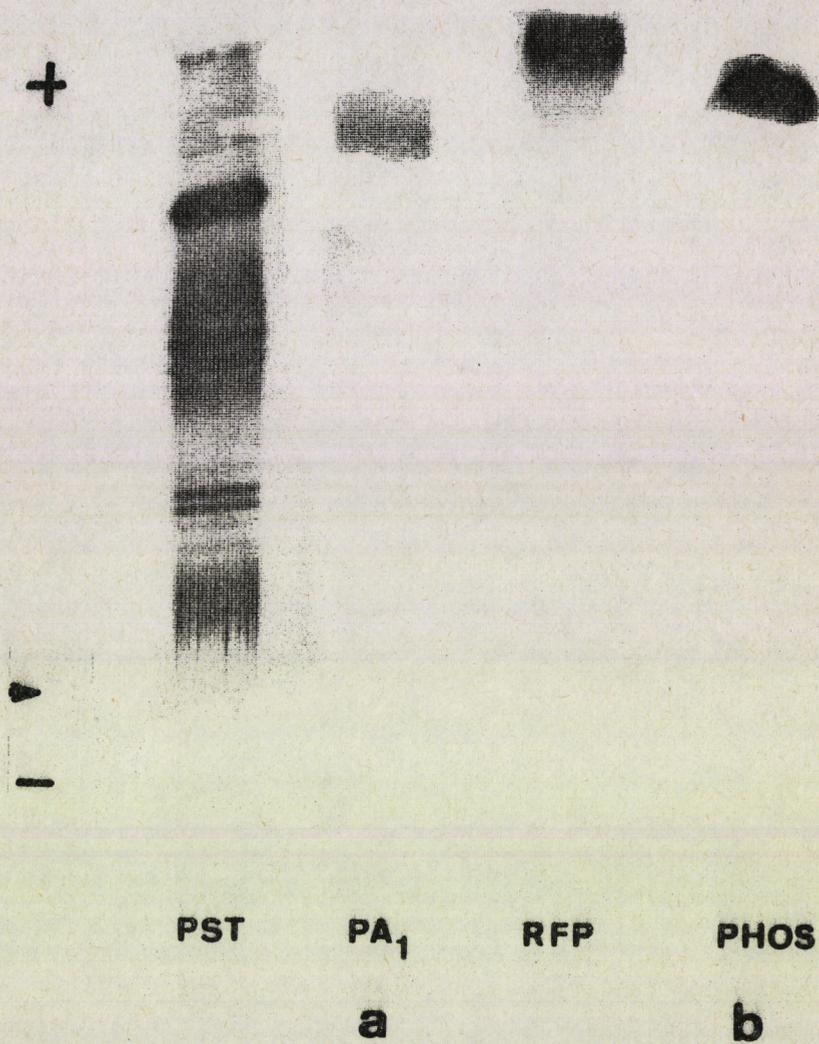


Figure 41

Electrophorèses en Gel d'Acrylamide - Agarose
 Des Composés à Comportement Préalbuminique :
 PA₁, Riboflavoprotéine (RFP) et Phosvitine (PHOS)
 PST : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf
 a - Révélation au Bleu de Coomassie
 b - Révélation au Bleu de Toluidine.

2° - PROPRIETES OPTIQUES

a) Absorption de la lumière

Les courbes d'absorption de la lumière ont été réalisées en cuves de 1 cm de trajet optique sur des solutions de protéides à 0,1 % dans l'eau à pH 7. Elles révèlent un maximum d'absorption à 278 nm, dans l'ultra-violet, longueur d'onde à laquelle nous avons mesuré le coefficient d'extinction : $E_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p. } 100}$.

Pour ce qui est de la riboflavoprotéine, nous avons tracé la courbe d'absorption en lumière visible, elle présente deux maxima : l'un à 375 nm, l'autre à 458 nm. Nous en avons déduit, pour ce composé, deux valeurs du coefficient d'extinction $E_{375 \text{ nm}}^{1 \text{ p. } 100}$ et $E_{458 \text{ nm}}^{1 \text{ p. } 100}$.

Les valeurs que nous avons obtenues sont rassemblées dans le Tableau XXVI (p. 155).

b) Pouvoir rotatoire spécifique

Les mesures ont été effectuées à 546 nm, sur des solutions à 800 mg de protéides pour 100 ml de tampon phosphate - citrate 0,1 M de pH 6,5 à l'aide d'un micropolarimètre ZEISS. Dans ces conditions, nous avons obtenu pour les composés étudiés, les valeurs figurant au Tableau XXVI (p. 155).

3° - POINTS ISOELECTRIQUES

a) Mode opératoire

Nous avons déterminé les points isoélectriques des constituants à comportement préalbuminique par électrofocalisation en gel.

Cette technique est due, semble-t-il à WRIGLEY (1968) (477) qui a associé l'électrofocalisation et l'électrophorèse en disque. La même année, ANDER (1968) (478) a décrit l'électrofocalisation en gel de polyacrylamide en plaque dont le protocole a été repris dans la revue générale publiée par HAGLUND (1971) (479).

A la suite de SAVAGE et THOMPSON (1971) (480), HEBERT (1972) (481) a utilisé cette technique pour étudier les protéides de la bière. Nous avons appliqué le mode opératoire proposé par ce dernier.

Tableau XXVI
Propriétés Physiques Comparées des Constituants à Comportement Préalbuminique

	1 p. 100 E 278 nm	1 p. 100 E 375 nm	1 p. 100 E 458 nm	(α) 22° C 546 nm (a)	PI (b)
Riboflavoprotéine	11,5	1,25	1,3	- 47°,5	4,0
Phosvitine	6,0	-	-	- 57°,5	4,75 - 5,1
PA ₁	1,4	-	-	- 31°,25	3,8 - 4,0

(a) : en tampon phosphate - citrate 0,1 M pH 6,5 ,

(b) : déterminé par électrofocalisation au gel de polyacrylamide.



Après la migration, le gel est découpé latéralement à l'aide d'un emporte-pièce, selon la technique préconisée par AWDEH (1968) (482) et les disques ainsi obtenus sont immergés dans 1 ml d'eau distillée, en tubes à hémolyse. Après deux heures, le pH est mesuré dans chaque tube à l'aide d'une microélectrode. On peut alors tracer une courbe, donnant le pH en fonction de la distance de migration (Figure 42, p. 157). Le gradient de PH obtenu n'est pas linéaire, aussi, la détermination de la courbe s'impose t-elle.

La révélation des électrophorogrammes peut être faite, soit au bleu de coomassie, soit par la coloration au P.A.S., pour la riboflavoprotéine et le composé PA₁. Quant à la phosvitine, elle est mise en évidence selon la technique de CALDWELL et PIGMAN (1965) (483) par immersion du gel dans une solution de bleu alcian* à 0,2 % pendant 4 heures.

b) Résultats - Conclusion

L'examen de la Figure 42 (p. 157) nous amène à donner, pour les composés étudiés, les points isoélectriques rassemblés au Tableau XXVI (p. 155).

Le composé PA₁, a un comportement anodique, ce à quoi on pouvait s'attendre étant donnée sa richesse en glucides (15,7 % d'acide sialique) et son comportement chromatographique sur CM - Cellulose. Le diagramme obtenu est composé de deux bandes l'une correspondant au pH de 3,8, l'autre à celui de 4,0.

L'image donnée par la riboflavoprotéine est composée d'une bande majeure, située dans la zone où le pH est de 4,0. Ce résultat est peu différent de celui de 4,1 - 4,2 proposé par OSTROWSKI et Coll (1968) (484).

B - PROPRIETES CHIMIQUES

1° - COMPOSITION EN PHOSPHORE

a) Méthode

Le phosphore a été dosé après minéralisation par la méthode colorimétrique d'ALLEN (1940) (485).

* Bleu Alcian : GURR'S - 19.519.

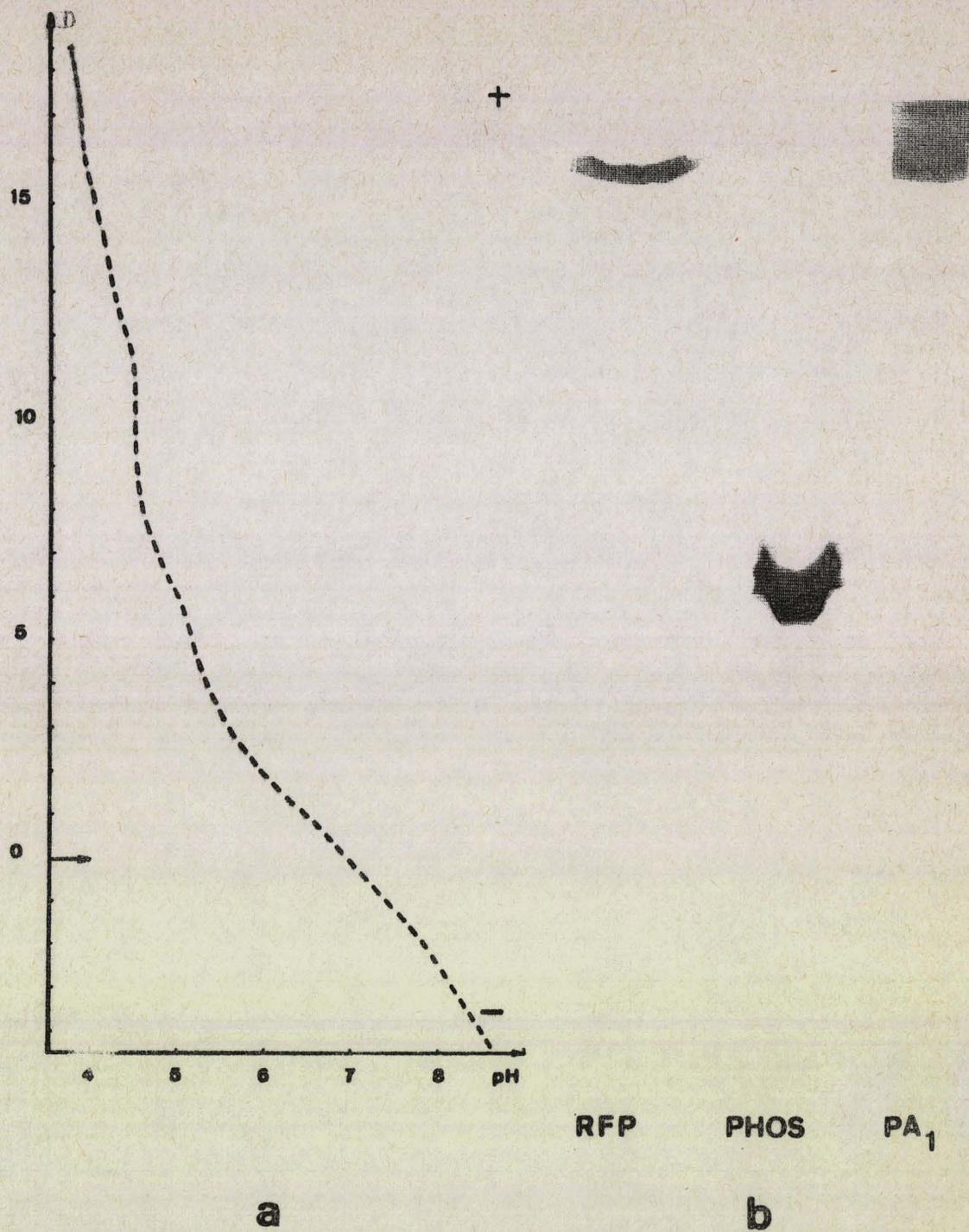


Figure 42

Electrofocalisation en Gel de Polyacrylamide
Des Composés à Comportement Préalbuminique

a - Gradient de pH,

b - Schémas Electrophorétiques de la Riboflavoprotéine (RFP),
de la Phosvitine (PHOS) et de PA₁.

b) Résultats - Discussion

Les valeurs que nous avons obtenues sont rassemblées au Tableau XXVII (p. 159). Pour ce qui est de la riboflavoprotéine, la teneur en phosphore est nettement plus élevée que celle qui est donnée par OSTROWSKI et Coll (1962) (485 bis).

La teneur en phosphore de la phosvitine que nous avons préparée est légèrement inférieure à celle de 9,7 % qui est donnée par MECHAM et OLCOTT (1949)(486). Cela est vraisemblablement dû au fait que notre phosvitine est dans un moins bon état de pureté que celle des auteurs.

Enfin, le composé PA, ne contient pas de phosphore, le chiffre que nous avons obtenu n'étant pas significatif de la présence du phosphore dans la molécule.

2° - COMPOSITION DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

a) Composition Centésimale en Glucides

1. Méthodes

Les glucides ont été déterminés par les méthodes colorimétriques préconisées par MONTREUIL et SPIK (1963) (487) :

- Les oses neutres ont été dosées par la méthode à l'orcinoï sulfuriq ue de TILLMANS et PHILIPPI (1929) (488) modifiée par RIMINGTON (1931) (489),

- Les osamines sont déterminées, après hydrolyse chlorhydrique, par la méthode d'ELSON et MORGAN (1933) (490), modifiée par MONTREUIL et SPIK (1963) (491),

- Enfin, nous avons utilisé la méthode de WERNER et ODIN (1949) (492) (1952) (493), à la diphénylalanine, pour doser l'acide sialique.

2. Résultats

Les résultats sont rassemblés au Tableau XXVIII (p. 160). Ils sont à rapprocher, pour la riboflavoprotéine et la phosvitine, de ceux qui ont été obtenus et proposés par les auteurs.

b) Composition en "oses neutres"

1. Méthodes

Les protéides sont traités par le méthanol chlorhydrique, en tubes scellés pendant 24h à 80° C afin de libérer les oses neutres. Les monosaccharides sont ensuite dosés, sous la forme de leurs dérivés méthylglycosidiques, par chromatographie en

Tableau XXVII
Composition Centésimale en Phosphore
des Constituants à Comportement Préalbuminique

Constituant	Phosphore en g p. 100 g
Riboflavoprotéine	2,85
Phosvitine	8,78
PA ₁	0,01

Tableau XXVIII
Composition en Glucides des Constituants
à Comportements Préalbuminiques

Glucides g p. 100 g	Riboflavoprotéine	Phosvitine	PA ₁
<u>Composition Centésimale</u>			
Oses Neutres	5,8	2,6	28
Osamines	3,89	1,2	14
Acide Sialique	3,85	1,7	15,7
Oses Neutres/Osamines	1,49	2,17	2,0
Oses Neutres/Ac. Sialique	1,51	1,53	1,78
<u>Composition en Oses Neutres</u>			
Galactose	3,21	1,11	11,61
Glucose	0,51	0,38	2,52
Mannose	2,08	1,11	13,87



phase gazeuse selon la technique de CLAMP, DAWSON et HOUGH (1967) (494) modifiée par FOURNET (1973) (495).

2. Résultats

Les compositions en oses neutres des constituants à comportement préalbuminique, que nous avons obtenues, figurent au Tableau XXVIII (p. 160).

c) Conclusions

1. Riboflavoprotéine

La teneur en "oses neutres" du composé que nous avons obtenu est plus faible que celle qui est proposée par OSTROWSKI et Coll (1968) (496) (voir p. 71).

Par contre, notre composé est plus riche en acide sialique que celui des auteurs.

Enfin, les teneurs en osamines sont comparables. Quant à la composition en "oses neutres", notre résultat est comparable à celui des auteurs, bien que nous n'ayons pas mis en évidence de fucose dans la molécule.

Il est difficile de conclure, étant donné que le constituant, que nous avons obtenu, n'est pas pur. Toutefois, OSTROWSKI et Coll (1968) (497) pensent que l'acide sialique ne fait pas partie de la molécule, ce qui paraît en désaccord avec notre résultat.

2. Phosvitine

Les résultats que nous avons obtenus pour les oses et les osamines sont comparables à ceux de ALLERTON et PERLMAN (1965) (498) (voir p. 61).

Nous avons obtenu une teneur de 1,7 % d'acide sialique, mais, notre composé n'étant pas pur, il n'est pas possible de conclure que l'acide sialique fait partie de la molécule de phosvitine. Il serait néanmoins intéressant de préciser ce point.

3° - COMPOSITION DE LA FRACTION PROTIDIQUE

a) Méthodes

Les acides aminés ont été déterminés, dans chacun des trois composants à comportement préalbuminique, par chromatographie à l'auto-analyseur Beckman, après une hydrolyse chlorhydrique.

Le tryptophane a été dosé et simultanément avec la tyrosine par la méthode spectrophotométrique de GOODWIN et MORTON (1946) (499).

b) Résultats - Discussion

Le Tableau XXIX (p. 163) regroupe les résultats correspondant aux trois composés.

1. Les chiffres que nous avons obtenus, concernant la riboflavoprotéine du jaune d'oeuf, sont comparables à ceux qui ont été proposés par OSTROWSKI et Coll (1968) (500) (voir p. 73). Il faut souligner les fortes teneurs en acides aspartique et glutamique, ainsi qu'en sérine.

2. De la même façon, les résultats obtenus à propos de la phosvitine peuvent être rapprochés de ceux d'ALLERTON et PERLMAN (1965) (501) (voir p. 61). La phosvitine est riche en sérine, bien que la teneur de notre composé soit légèrement inférieure à celle qui est donnée par les auteurs. Par ailleurs, le composé ne renferme pas de cystine, notre résultat étant en accord avec celui des auteurs sur ce point.

3. Enfin, la détermination de la composition centésimale en acides aminés permet de distinguer PA₁ des deux autres composés à comportement préalbuminique étudiés. PA₁ renferme une forte teneur en tyrosine et par ailleurs ne renferme pas de cystine.

C - CONCLUSIONS CONCERNANT LES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES CONSTITUANTS A COMPORTEMENT PREALBUMINIQUE.

L'examen des résultats obtenus permet de dire qu'il s'agit de trois composés présents dans le jaune d'oeuf, présentant entre eux des analogies (comportement électrophorétique en gel d'acrylamide - agarose), mais nettement individualisés les uns par rapport aux autres.

Deux de ces composés, la riboflavoprotéine et la phosvitine ont été étudiés et le rapprochement des résultats que nous avons obtenus avec ceux des auteurs a pu être fait. En ce qui concerne la riboflavoprotéine, nos résultats sont voisins de ceux de OSTROWSKI et Coll (1968) (502) et la conclusion de JAKUBCZAK (1971) (503), selon

Tableau XXIX
Composition Centésimale des Acides Aminés des
Composés à Comportement Préalbuminique

Acides Aminés en g p. 100 g	Riboflavoprotéine	Phosvitine	PA ₁
Acide Aspartique	<u>8,16</u>	4,42	3,53
Acide Glutamique	<u>10,00</u>	4,21	1,33
Arginine	3,80	4,57	0,47
Histidine	2,40	3,89	0,37
Lysine	4,30	5,25	4,39
Alanine	2,96	1,54	1,66
Cystine / 2	5,75	0	0
Glycocolle	1,27	0,96	0,33
Isoleucine	2,16	0,47	0,31
Leucine	2,77	1,00	0,50
Méthionine	1,00	0,41	0,09
Phénylalanine	1,95	1,00	0,75
Proline	2,85	0,91	0,93
Sérine	<u>11,64</u>	<u>25,00</u>	1,04
Thréonine	6,00	1,64	2,42
Tryptophanne	3,65	0,77	11,71
Tyrosine	3,80	1,05	<u>11,50</u>
Valine	1,37	1,03	2,34

laquelle les flavoprotéides du blanc et du jaune d'oeuf sont différents, se trouve renforcée. Cependant, la teneur élevée en acide sialique à laquelle nous aboutissons est en contradiction avec la conclusion de OSTROWSKI et Coll (1918) (504). Pour ces auteurs, l'acide sialique ne fait pas partie de la molécule de riboflavoprotéine.

Les données que nous avons acquises concernant le composé PA_1 , bien que fragmentaires, n'en permettent pas moins de distinguer très nettement ce nouveau composé du jaune d'oeuf des deux autres.

V - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LES COMPOSES

A COMPORTEMENT PREALBUMINIQUE.

L'électrophorèse en gel mixte d'acrylamide - agarose nous a amené à caractériser trois composés à comportement préalbuminique dans les protéines solubles totales (PST - 4 et PST - 5), que nous avons appelés PA_1 , PA_2 , et PA_3 par ordre de mobilité croissante (voir p. 115).

Nous avons montré que le composé PA_3 correspond à la riboflavoprotéine, puis isolé le composé PA_1 , jusqu'alors inconnu. Nous avons établi, par ailleurs, que la phosvitine, qui possède également un tel comportement en électrophorèse, n'est pas identifiable à l'un de ces composés.

L'étude de leurs propriétés physicochimiques nous a permis de préciser leur nature :

- La riboflavoprotéine (PA_3) est une glycoprotéine et nous savons qu'elle fixe la vitamine B_2 , responsable de sa coloration en jaune,
- La phosvitine est une phosphoprotéine, riche en phosphore (10 %),
- Enfin, PA_1 est une glycoprotéine, très riche en glucides (57 % de glucides totaux).

Il reste donc à isoler PA_2 . La chromatographie d'échange d'ions sur CM - Cellulose des protéines solubles totales (PST - 4 et PST - 5) conduit à une fraction A_1 renfermant en mélange les trois composés PA_1 , PA_2 et PA_3 . Cette fraction doit donc être soumise à un autre type de chromatographie, afin de préparer PA_2 .

Nous n'y sommes pas parvenus jusqu'à présent.

3 - ISOLEMENT ET ETUDE DU VITELLOMUCOIDE

Le vitellomucoïde a été caractérisé par ONOE (1936) (505) qui a isolé ce composé du jaune d'oeuf, après extraction des protéines solubles et fractionnement au sulfate d'ammonium, traitement par la chaleur, le vitellomucoïde étant enfin précipité par l'alcool.

La première étape de sa préparation nous a conduit aux protéines solubles totales, méthode 5 (PST - 5) (voir p. 103).

SEZILLE (1964) (506) a fait une étude critique de cette préparation, mettant en évidence les imprécisions qu'elle comporte, pouvant être la cause d'une mauvaise reproductibilité.

Il aurait été logique, pour préparer le vitellomucoïde, de fractionner le mélange des protéines solubles totales, méthode 5 (PST - 5).

En fait, le composé que nous avons caractérisé, proche par ses propriétés de celles connues, du vitellomucoïde, a été mis en évidence, par hasard, lors de l'étude chromatographique du mélange des protéines solubles totales, méthode 3 (PST - 3).

I - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES PST - 3

A la suite de MANDELES (1960) (507), RAPPAPORT et LEONIS (1962) (508), nous avons soumis les protéines solubles totales que nous avons préparées selon la méthode 3 (PST - 3), à l'analyse chromatographique sur différents supports (résines échangeuses d'ions, tamis moléculaires). Toutes ces expériences ont révélé l'hétérogénéité des protéines solubles totales du jaune d'oeuf.

Le choix du mélange PST - 3, pour ces fractionnements, se justifiait à nos yeux, étant donnée la moins grande complexité révélée par l'électrophorèse en gel d'acrylamide - agarose, et par ailleurs nous disposions d'un immun-sérum anti-PST - 3.

Au cours de cette étude, les fractions obtenues ont été systématiquement analysées :

- . Détermination de la composition centésimale en glucides,
- . Etude électrophorétique,
- . Etude immunoélectrophorétique.

Des différents fractionnements chromatographiques réalisés, l'un d'eux nous a paru particulièrement intéressant, en ce qu'il permet de caractériser une fraction riche en glucides.

A - PRINCIPE

Nous avons soumis les protéines solubles totales (PST - 3) à un fractionnement chromatographique sur DEAE - Cellulose, selon un procédé voisin de celui utilisé par JAKUBCZAK (1971) (509).

B - MODE OPERATOIRE

2 g des protéines solubles totales (PST - 3), dissous dans 20 ml de tampon phosphate 0,005 M pH 5,0 , sont soumis à la chromatographie sur des colonnes (2,0 cm × 40,0 cm) de DEAE - Cellulose (DE - 32 Whatman) stabilisée avec le même tampon phosphate 0,005 M pH 5,0 .

L'élution des colonnes est réalisée à l'aide d'un gradient discontinu de concentration en NaCl, par passage successif :

- . Du tampon de stabilisation de la cellulose modifiée,
- . Et d'un tampon phosphate 0,005 M dont la concentration en NaCl a été portée successivement à 0,05 M et 0,2 M.

La vitesse de passage des tampons est réglée à 25 ml/h. cm² et des fractions de 8 ml sont recueillies toutes les 6 minutes.

Les solutions effluentes sont analysées en continu par spectrophotométrie U. V. afin de repérer les protéines : le diagramme obtenu est donné à la Figure 43 (p. 168).

Par ailleurs, 1 ml de chaque fraction recueillie est prélevé pour dosage d'acide sialique selon la méthode de WERNER et ODIN (1949 - 1952) (510) (511). Les points ainsi obtenus sont reliés par une courbe (Figure 43)(p.168).

Après regroupement, les fractions sont dialysées et lyophilisées : les protéides sont alors soumis aux analyses chimiques (composition centésimale en glucides), électrophorétique et immunoélectrophorétique.

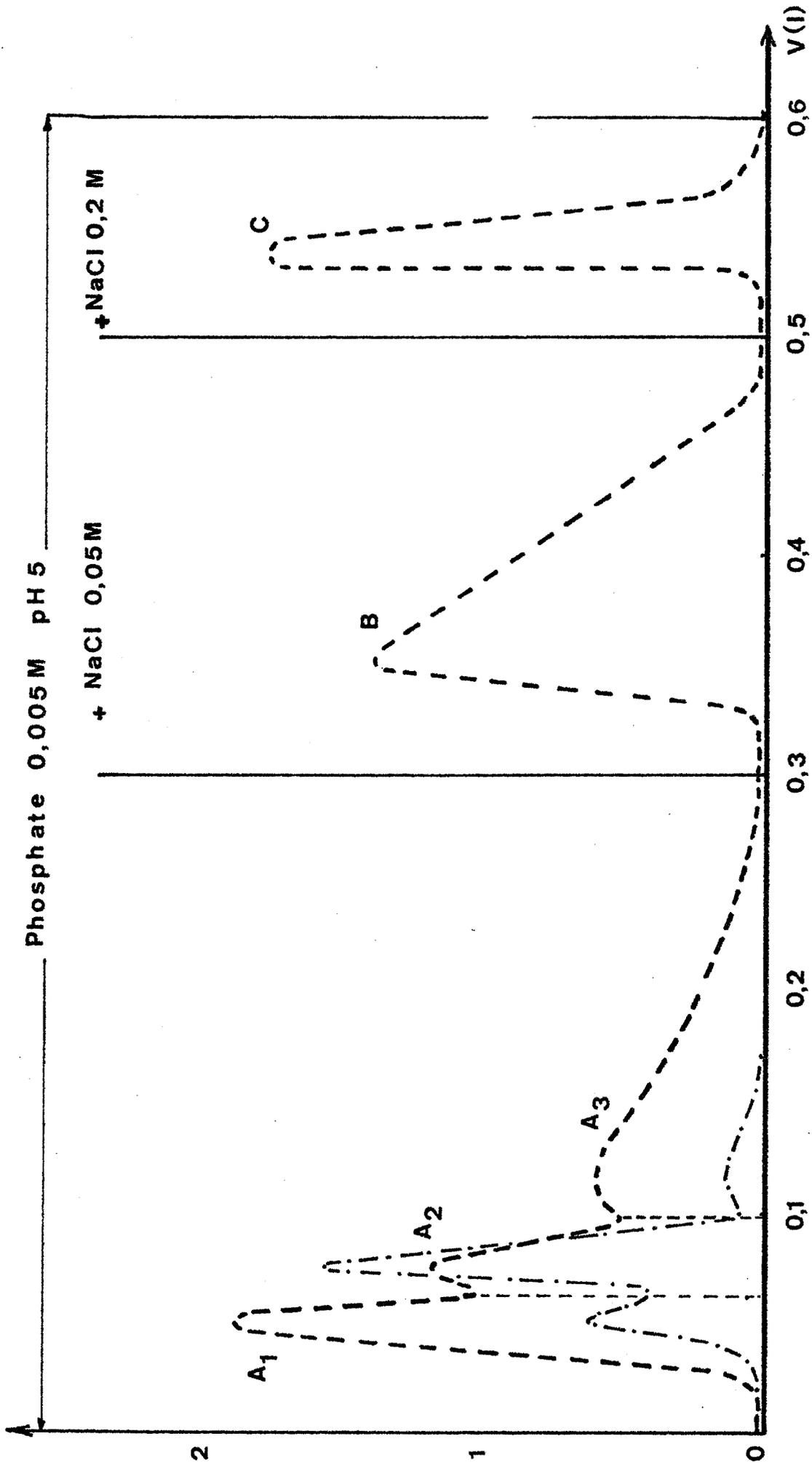


Figure 43

Chromatographie des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST - 3)

sur DEAE - Cellulose : Diagramme d'Elution

----- : Protéines : 280 nm ; -.-.-.-.- : Acide Sialique : 530 nm.



C - RESULTATS

Le résultat du fractionnement est illustré par la Figure 43 (p.168).

5 fractions ont été obtenues.

Les protéides des fractions A ne sont pas retenus par la cellulose échangeuse d'anions, la fraction A₁ étant éluée avec le front du tampon phosphate 0,005 M de pH 5,0.

Le dosage d'acide sialique permet de regrouper les solutions effluentes correspondant à la fraction A₂. Il est en effet possible de mettre en évidence, dans l'effluent, une forte teneur en acide sialique.

Le pic B, bien que dissymétrique, est récupéré en une seule fraction.

Enfin, le pic C correspond à des constituants bien fixés sur la résine.

Les rendements de cette chromatographie sont les suivants :

A ₁	: 233 mg,
A ₂	: 90 mg,
A ₃	: 170 mg,
B	: 540 mg,
C	: 450 mg.

La détermination de la composition centésimale en glucides de chacune de ces fractions, donnée au Tableau XXX (p.170).

L'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose, révèle que la fraction A₁ est hétérogène et migre au niveau de la livétine γ (voir Figure 44, p.171). Les fractions A₂, A₃ et B sont plus homogènes et migrent toutes trois au niveau de la livétine β . Enfin, la fraction C est très enrichie en un constituant correspondant vraisemblablement à la livétine α . Ce type d'électrophorèse ne permet pas de discerner les fractions A₂, A₃ et B qui présentent cependant des différences sensibles de composition chimique.

L'analyse immunoelectrophorétique (Figure 45, p. 172), ne permet pas non plus, de mettre en évidence de différence entre les trois fractions A₂, A₃ et B. Dans la zone de migration correspondant à la livétine β , zone où se situe le vitello-mucoïde (WILLIAMS - 1962) (512), (SEZILLE - 1964) (513), ces trois fractions présentent deux arcs, correspondant vraisemblablement aux arcs de précipitation 4 et 5 du mélange PST - 3. (voir Figure 25, p. 121).

La fraction A₁ présente un diagramme immuno-électrophorétique assez simple où il est possible de caractériser deux arcs à comportement cathodique.

Tableau XXX
Composition Centésimale en Glucides des Fractions
Obtenues par Chromatographie sur DEAE - Cellulose des PST - 3

Désignation des Fractions*	Oses "Neutres" p. 100	Osamines p. 100	Acide Sialique p. 100	Oses ----- Osamines	Oses ----- Ac. Sialique
A ₁	5,4	3,7	2,8	1,46	1,93
A ₂	9,75	7,35	6,6	1,32	1,48
A ₃	5,2	3,7	1,8	1,4	2,9
B	6,3	3,56	2,08	1,77	3
C	2,66	1,36	1,43	2,0	1,86

(* voir la Figure 43 (p. 168)).



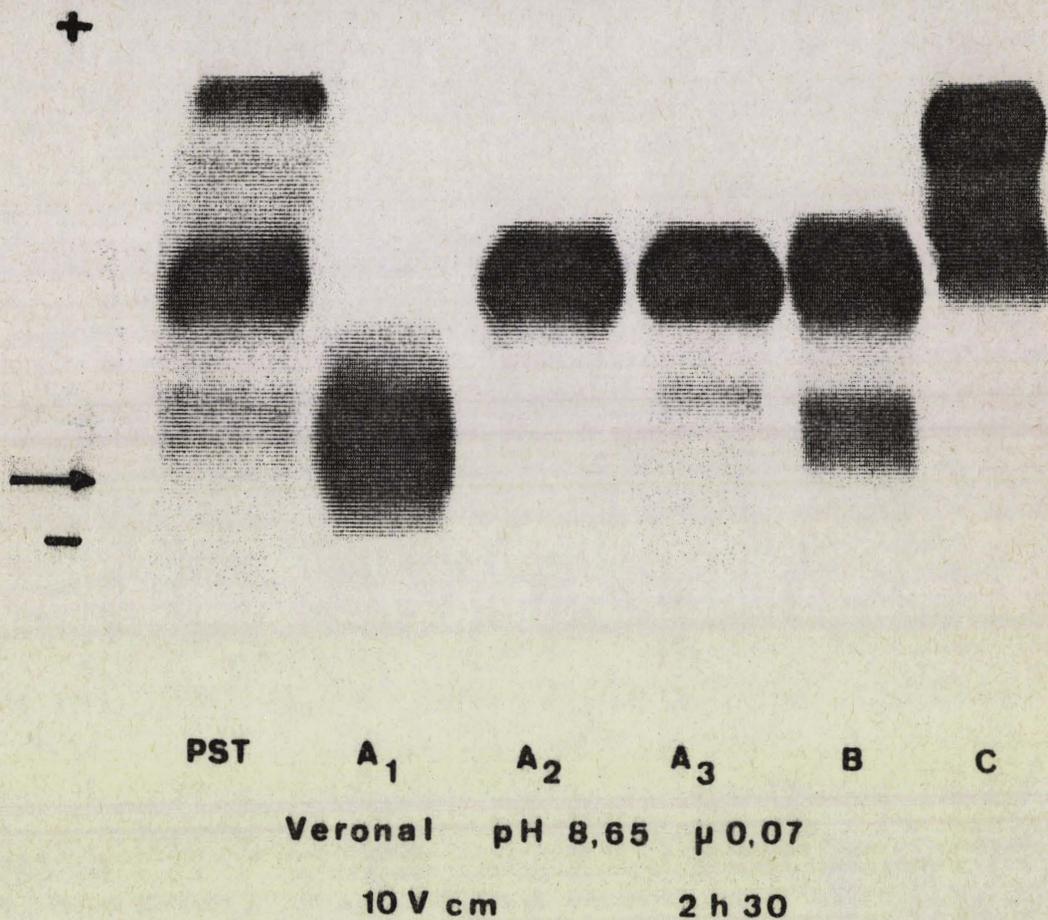


Figure 44
 Electrophorèses sur Acétate de Cellulose
 Des Fractions Obtenues par Chromatographie
 Des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST)
 sur DEAE - Cellulose



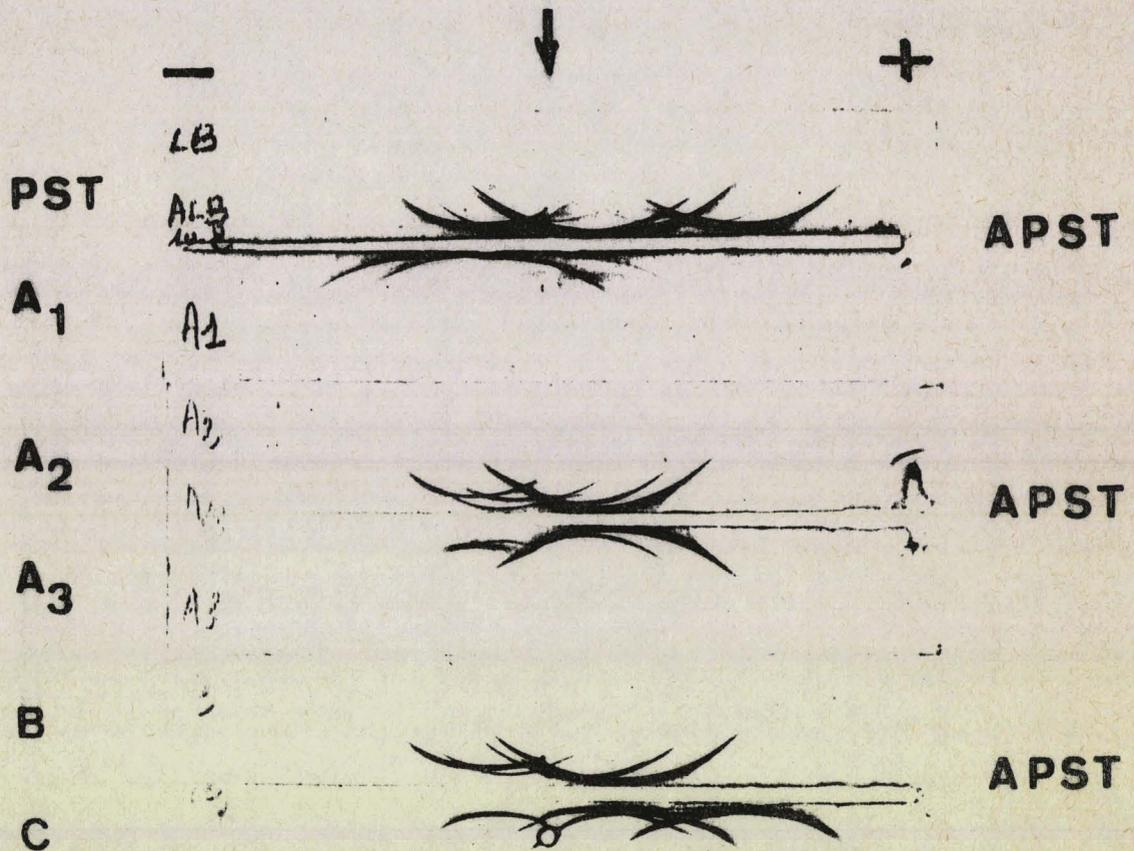


Figure 45
Immunoélectrophorèses des Fractions Obtenues par Chromatographie
Des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST)
sur DEAE - Cellulose

A. PST : Immunsérum anti-Protéines Solubles Totales

Enfin, la fraction C se révèle très hétérogène, le diagramme obtenu se rapprochant de celui des protéines solubles totales (PST), la zone cathodique du diagramme étant toutefois légèrement différente.

D - CONCLUSIONS

La chromatographie des PST - 3 sur DEAE - Cellulose permet de préparer une fraction glycoprotéique riche en glucides.

Ni l'électrophorèse sur acétate de cellulose, ni l'immunoélectrophorèse ne permettent de mettre en évidence entre les fractions A₂, A₃ et B une différence permettant de localiser la fraction riche en glucides.

Toutefois, l'électrophorèse sur acétate de cellulose révèle dans la fraction A₂ la présence d'un composant majeur migrant au niveau de la β livétine.

Le rendement de la chromatographie, en ce qui concerne A₂ est faible. Nous avons essayé, sans succès, de modifier le procédé de fractionnement (augmentation de la taille des colonnes...) pour préparer de plus grandes quantités de cette fraction, en vue de la soumettre à un autre type de chromatographie.

Nous avons donc cherché à mettre au point un autre procédé de préparation d'une fraction de ce type, capable de donner un meilleur rendement.

II - ISOLEMENT DU CONSTITUANT C

Selon ONOE (1936) (514) le vitellomucoïde est difficile à précipiter. Une des étapes de la préparation de ce composé consiste en une précipitation au sulfate d'ammonium des protéines solubles du jaune autres que le vitellomucoïde.

Il était donc logique de fractionner les protéines solubles totales du jaune par le sulfate d'ammonium, afin de préparer une fraction riche en glucides contenant le vitellomucoïde pour ensuite la soumettre à l'analyse chromatographique en vue de purifier ce composé.

La fraction A₂ ayant été isolée sur DEAE - Cellulose, à partir des PST - 3 il nous a paru souhaitable de travailler sur le même mélange protéique.

A - FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM DES PST - 3

1° - PRINCIPE

A la suite de GORINI et LANZA-VECCHIA (1955) (515) nous avons pensé à soumettre les protéines solubles totales du jaune d'oeuf à des précipitations fractionnées à l'aide du sulfate d'ammonium. Nous les avons, de plus, associées à un gradient de pH pour essayer d'améliorer la séparation des différents constituants du mélange des protéines solubles totales (PST - 3).

2° - MODE OPERATOIRE

Le schéma du fractionnement que nous avons mis au point est donné à la Figure 46 (p. 175).

Le procédé comporte les étapes classiques ; toutefois, l'étape du précipité P_2 (1/3 de saturation à pH 4,0) a été éliminée. En effet, les essais que nous avons réalisés ont montré que P_2 était en tous points semblable à P_3 (composition en glucides, analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique).

Le surnageant obtenu à 1/2 saturation et pH 4,0 est récupéré dialysé contre eau courante puis contre eau distillée et lyophilisée : c'est la fraction S_4 .

Au cours de ce fractionnement, les précipités sont repris par la solution qui a servi à les obtenir afin de les purifier.

3° - RESULTATS

Ce procédé permet d'obtenir 4 fractions.

Les rendements de ce fractionnement, conduit sur 15 g des PST - 3, sont les suivants :

P_1	:	0,503	g.
P_3	:	6,1	g.
P_4	:	1,730	g.
S_4	:	0,750	g.

La détermination de la composition centésimale en glucides de chaque fraction (Tableau XXXI, p. 176) montre que la fraction S_4 est riche en glucides.

15 g de **PST 3**

Mis en solution à 5 % dans de l'eau distillée

Ajouter 1/2 vol. de sol. sat. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Ajuster à pH 7

Laisser reposer une nuit à 3° C

Centrifuger à 3° C, 30 mn à 5.500 t/mn

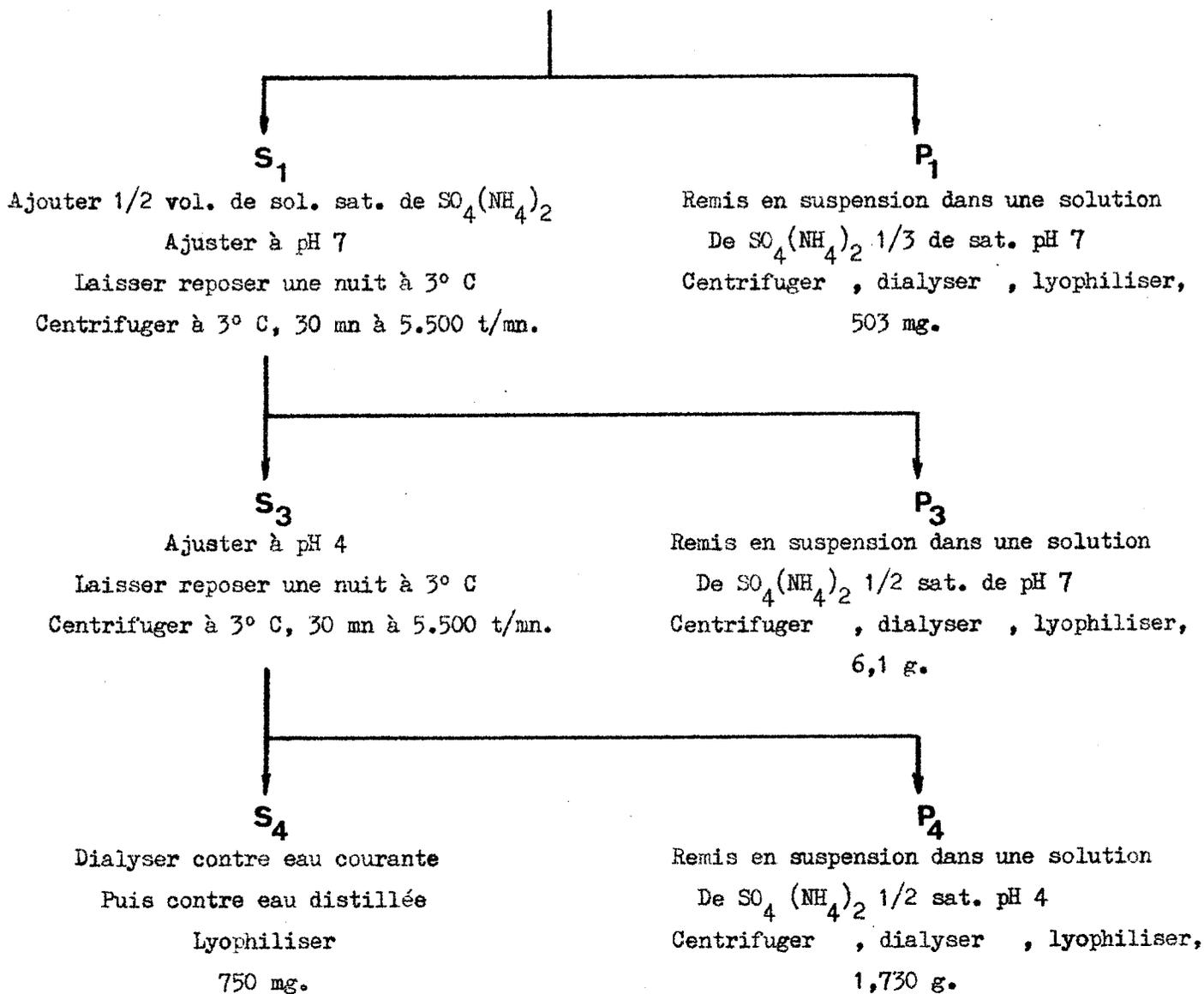


Figure 46

Schéma de Fractionnement au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Des Protéines Solubles Totales (PST - 3).



Tableau XXXI

Composition en Glucides des Fractions Obtenues par Fractionnement
 au $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ des PST - 3

Désignation des Fractions*	Oses "Neutres" p. 100	Osamines p. 100	Acide Sialique p. 100	Oses —— Osamines	Oses —— Ac. sialique
P ₁	3,05	1,5	0,97	2,05	3,15
P ₃	3,65	3,31	2,0	1,1	1,81
P ₄	2,0	1,42	0,71	1,4	2,8
S ₄	11,5	8,2	7,5	1,42	1,54

L'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose (Figure 47, p.178), montre qu'il est possible, à l'aide du sulfate d'ammonium de fractionner les protéines solubles totales du jaune en trois groupes correspondant aux précipités P_1 , P_2 et P_4 :

- Le précipité P_1 correspond aux composants les plus lents, migrant au niveau de la γ livétine,
- Le précipité P_2 est hétérogène mais contient une fraction majeure au niveau de la β livétine,
- Le précipité P_4 est très enrichi en un constituant ayant la vitesse de migration de l' α livétine.

Pour ce qui est de la fraction S_4 , hétérogène, elle comporte une fraction majeure ayant une mobilité électrophorétique sensiblement inférieure à celle de la livétine β .

L'immunoélectrophorèse, appliquée à ces fractions, (Figure 48, p.179) confirme ces résultats :

- La fraction P_1 présente un diagramme immunoélectrophorétique composé essentiellement de deux arcs dont un à comportement cathodique. Cette fraction est donc assez peu hétérogène.
- Les fractions P_3 et P_4 présentent des diagrammes beaucoup plus complexes.
- Enfin, la fraction S_4 paraît intéressante. En effet, le diagramme obtenu révèle 3 arcs de précipitation, que nous avons appelés a, b, c, de l'anode vers la cathode, dont un, l'arc b dans la zone de mobilité électrophorétique moyenne, correspondant à celle des arcs 4 et 5 des protéines solubles totales (voir Figure 25, p. 121) il n'est pas possible de dire s'il s'agit de l'arc 4 ou de l'arc 5. Les deux autres arcs sont l'un plus rapide : a, l'autre plus lent : c.

4° - CONCLUSIONS

Le fractionnement au sulfate d'ammonium des protéines solubles totales du jaune (PST - 3) selon le procédé que nous avons mis au point est intéressant pour plusieurs raisons :

1. Il permet la préparation d'une fraction S_4 riche en glucides présentant un composant majeur ayant une mobilité électrophorétique voisine de celle de la β livétine. Cette fraction est hétérogène et l'immunoélectrophorèse permet d'y mettre en évidence 3 constituants antigéniques.

2. Le rendement de préparation de cette fraction S_4 est relativement faible si on considère que le fractionnement est effectué sur 15 g des PST - 3, ce qui représente environ 150 oeufs. Mais néanmoins, il est convenable la fraction obtenue pouvant être soumise par la suite à l'analyse chromatographique.

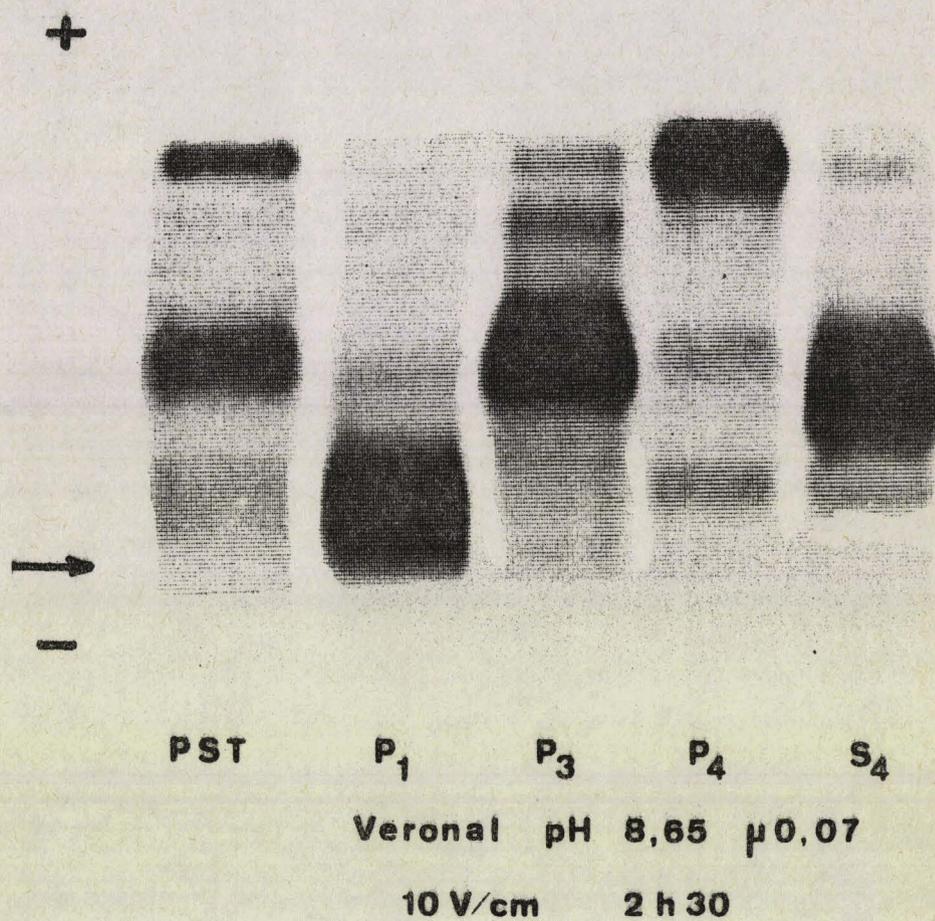


Figure 47

Electrophorèses sur Acétate de Cellulose
 Des Fractions Obtenues Par Précipitations au Sulfate d'Ammonium
 Des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST)



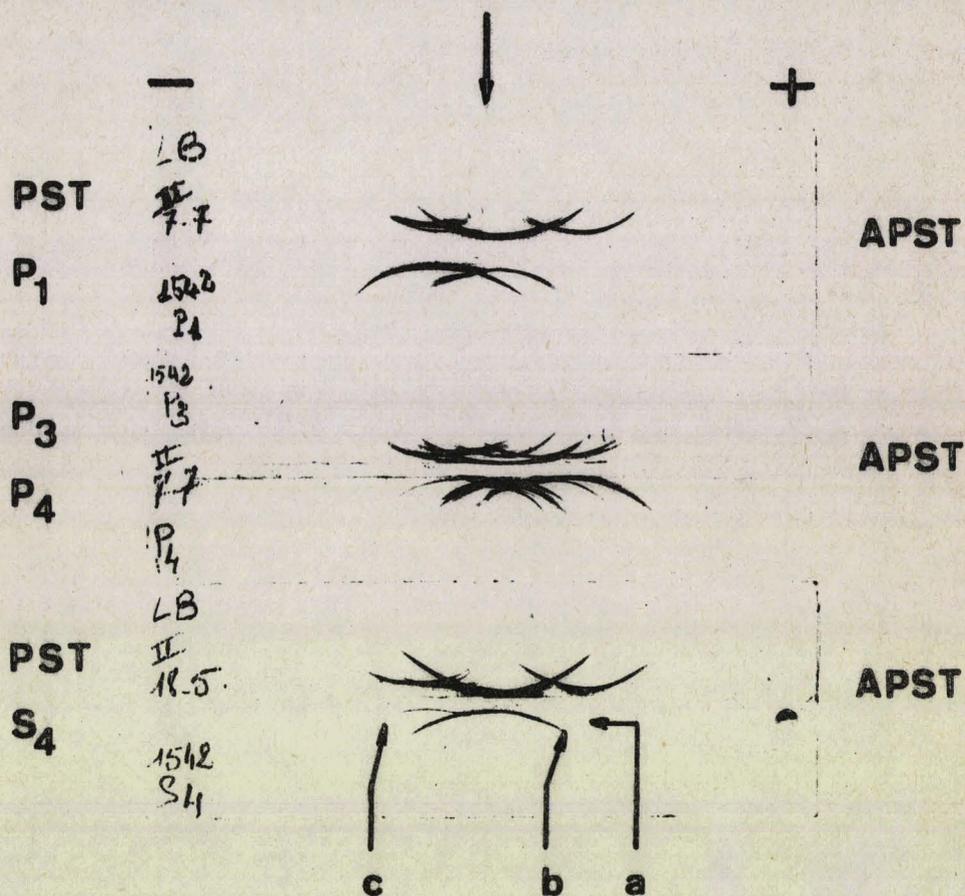


Figure 48

Immunoélectrophorèses des Fractions Obtenues
 Par Précipitations au Sulfate d'Ammonium
 Des Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf (PST)
 A. PST : Immunsérum Anti-Protéines Solubles Totales



3. Le procédé permet d'obtenir, outre cette fraction S_4 , d'autres fractions intéressantes, en particulier, la fraction P_1 . Ce précipité faiblement hétérogène doit permettre, après purification, l'isolement d'un constituant antigéniquement homogène.

Les précipités P_3 et P_4 peuvent être utilisés pour préparer les constituants majeurs qu'ils contiennent, l'un ayant la mobilité électrophorétique de la β livétine, l'autre celle de l' α livétine.

Par ailleurs, nous avons soumis les protéines solubles totales, préparées par les méthodes 4 et 5 (PST - 4 et PST - 5) à ce schéma de fractionnement. Les fractions S_4 récupérées sont comparables à celles que l'on obtient en fractionnant les PST - 3. Toutefois, elles sont plus hétérogènes, contenant, en particulier, la riboflavoprotéine.

B - PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION S_4

Le vitellomucoïde ayant, selon les auteurs (WILLIAMS - 1962) (516), (SEZILLE - 1964) (517) la mobilité électrophorétique de la livétine β d'une part, la fraction S_4 présentant dans cette zone un constituant majeur, révélé par l'électrophorèse et par l'immunoélectrophorèse d'autre part, il paraissait logique de chercher à isoler le constituant correspondant à cet arc de précipitation b (voir p. 177), par chromatographie de la fraction S_4 .

1° - PRINCIPE

Le constituant recherché apparaît, dans la fraction S_4 , en mélange avec un composé plus anodique et un composé au contraire plus cathodique. On pouvait donc s'attendre à éliminer le premier par fixation sur une résine échangeuse d'anions et le second par fixation sur une résine échangeuse de cations, la purification chromatographique se faisant donc en deux étapes.

2° - MODES OPERATOIRES

a) Chromatographie du S_4 sur DEAE - Cellulose

La chromatographie des PST - 3, sur DEAE - Cellulose, stabilisée en tampon phosphate 0,005 M pH 5 permet, nous l'avons vu, de séparer les protéides en trois groupes : les composants de faible mobilité électrophorétique d'une part, ceux de mobilité intermédiaire, d'autre part, et enfin, ceux de grande mobilité électrophorétique, les plus fortement fixés sur la cellulose modifiée. Par ailleurs, la fraction riche en glucides n'est pas retenue par l'échangeur d'ions.

Nous avons soumis la fraction S_4 , à ce même type de fractionnement chromatographique.

700 mg de la fraction S_4 , dissous dans 10 ml de tampon phosphate 0,005 M pH 5,0 sont soumis à la chromatographie sur une colonne (2,0 cm x 30,0 cm) de DEAE - Cellulose (DE - 32 Whatman) stabilisée avec le même tampon phosphate 0,005 M de pH 5,0.

L'élution de la colonne est réalisée à l'aide d'un gradient discontinu de concentration en NaCl, par passage successif :

- . Du tampon de stabilisation de la résine,
- . Du tampon phosphate, 0,005 M de pH 5 dont la concentration en NaCl a été portée à 0,2 M.

La vitesse de passage des tampons est réglée à 25 ml/h. cm^2 et des fractions de 8 ml sont recueillies toutes les 6 minutes.

Après regroupement, les fractions sont dialysées et lyophilisées.

b) Sous-Fractionnement du pic A

Les 350 mg de protéides correspondant au pic A, fraction riche en glucides, dissous dans 5 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 4,0, sont rechromatographiés sur une colonne (2,0 cm x 15,0 cm) de CM - Cellulose (CM - 32 - Whatman) stabilisée dans le même tampon acétate d'ammonium 0,1 M pH 4,0.

Le déplacement des constituants est effectué à l'aide d'un gradient de pH, par passage successif :

- . Du tampon de stabilisation de la résine,
- . D'un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7,0.

Les solutions effluentes sont regroupées, dialysées et lyophilisées.

3° - RESULTATS

a) Chromatographie du S_4 sur DEAE - Cellulose

1. Le diagramme chromatographique est donné à la Figure 49 (p.182), il comporte deux pics : A et B, donnant lieu, après dialyse et lyophilisation aux quantités de poudres suivantes :

- A : 380 mg
- B : 23 mg.

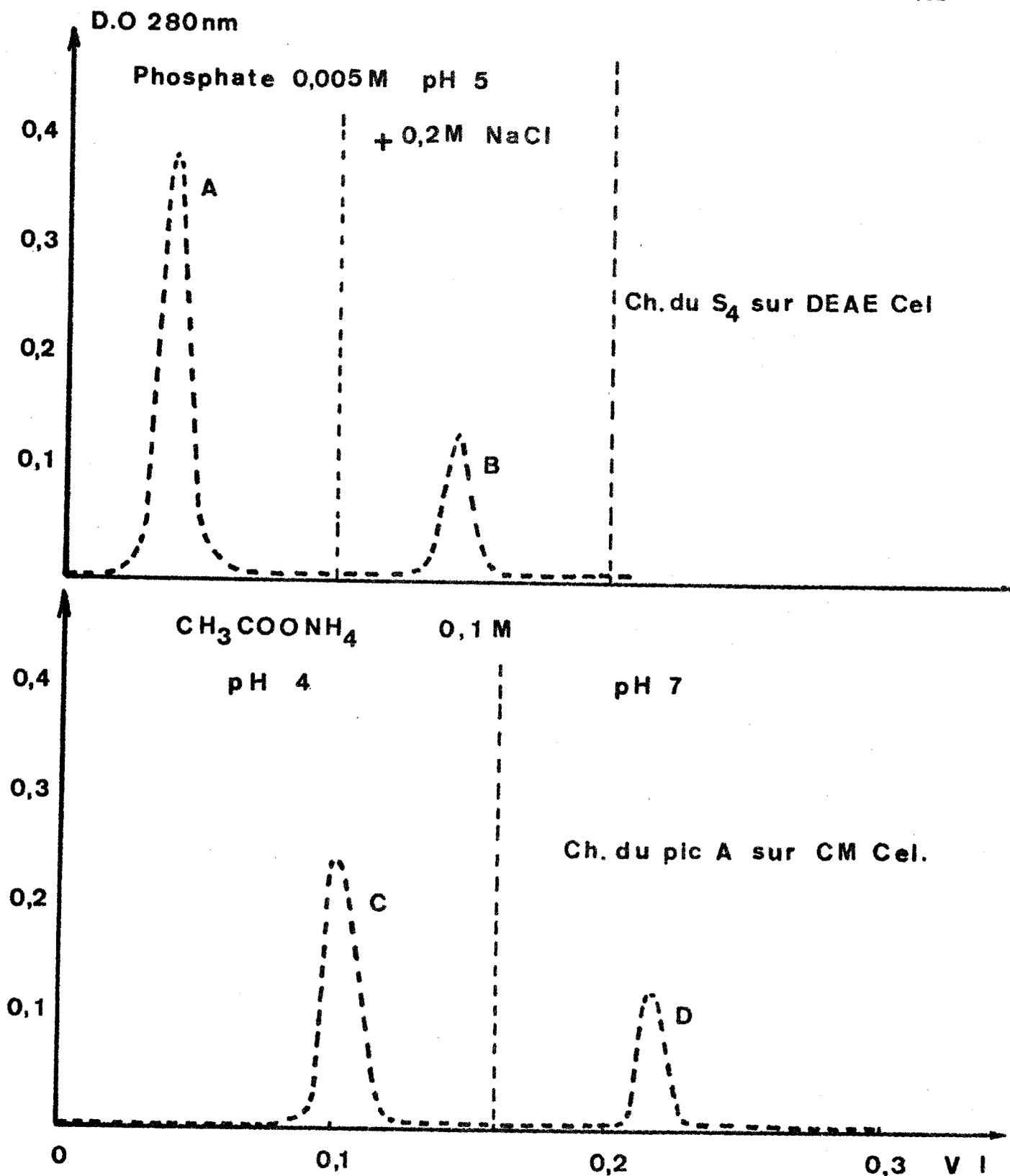


Figure 49
 Purification de la Fraction S₄ par Chromatographie
 Sur DEAE - Cellulose et
 Rechromatographie de la Fraction A Obtenue sur
 CM - Cellulose
 Diagrammes d'Elution

2. Les images électrophorétiques de ces fractions montrent que les protéides contenus dans la fraction S_4 ont été séparés en deux groupes (Figure 50, p.184). La fraction A correspond aux constituants les plus lents, la fraction B aux constituants anodiques, qui ont été fixés sur la résine.

3. L'immunoélectrophorèse de la fraction A (Figure 51, p. 185), révèle la présence de deux arcs, confirmant le résultat de l'électrophorèse sur acétate de cellulose. Sur la même figure, nous avons repris l'immunoélectrophorégramme de la fraction S_4 , sur lequel il est possible de caractériser 3 arcs a, b, c, (voir p. 179). Les deux arcs de la fraction A sont l'arc b et l'arc c. La chromatographie sur DEAE - Cellulose a donc permis d'éliminer, du mélange étudié, le constituant antigénique responsable de l'arc a, qui se retrouve dans la fraction B.

4. La détermination des glucides contenus dans les fractions (Tableau XXXII, p. 186) permet de constater que la fraction A est plus riche en glucides que la fraction S_4 qui a servi à faire la chromatographie. Les rapports oses/osamines et oses/acide sialique, ont par ailleurs les mêmes valeurs. Quant à la fraction B sa teneur en glucides est beaucoup plus faible. Il s'agit là d'impuretés qui ont été éliminées au cours de la chromatographie.

b) Sous-fractionnement du pic A

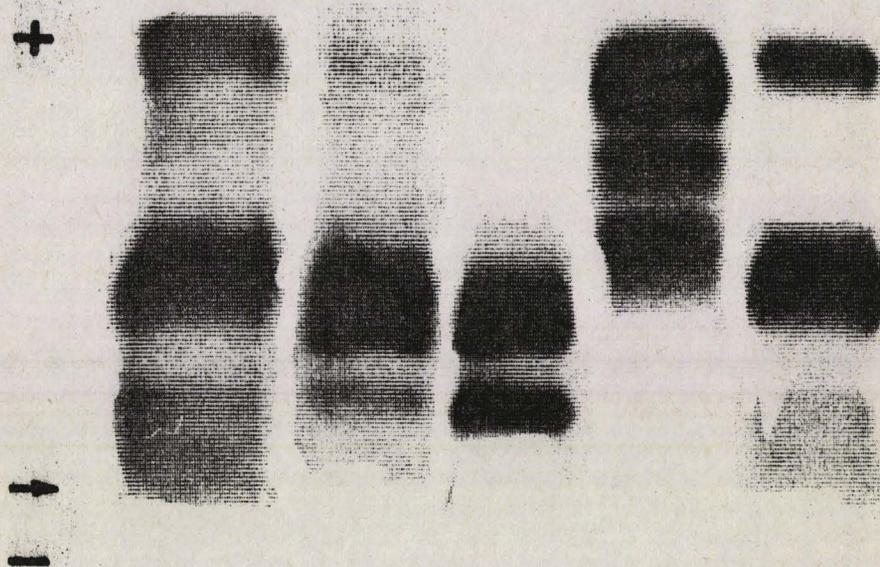
1. La Figure 49 (p. 182) illustre également le résultat de la rechromatographie du pic A sur CM - Cellulose. Aux deux tampons d'élution utilisés successivement, correspondent deux pics : C et D. Les rendements sont les suivants :

C	: 175 mg.
D	: 23 mg.

2. Les électrophorèses de ces fractions, sur acétate de cellulose ont été réalisées parallèlement à celles des fractions S_4 et A. (Figure 52, p. 187). On peut ainsi suivre le fractionnement du S_4 . En effet, l'image donnée par le pic C ne révèle qu'une seule tache. La fraction D correspond à un constituant plus lent que le constituant C.

3. La fraction C est immunologiquement homogène : c'est ce que révèle l'immunoélectrophorégramme de la Figure 51 (p. 185). De la comparaison avec les schémas des fractions S_4 et A, on peut déduire qu'il s'agit de l'arc b.

4. Le composé C est de nature glycoprotéinique, riche en glucides (37 % de glucides totaux) (Tableau XXXII, p. 186), les rapports oses/osamines et oses/acide sialique ayant des valeurs voisines de celles des mêmes rapports calculés pour les fractions S_4 et A.



PST S₄ A B PST

Veronal pH 8,65 μ 0,07

10V/cm 2h30

Figure 50
 Electrophorèses sur Acétate de Cellulose
 Des Fractions Obtenues par Chromatographie
 du S₄ sur DEAE - Cellulose
 PST : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf

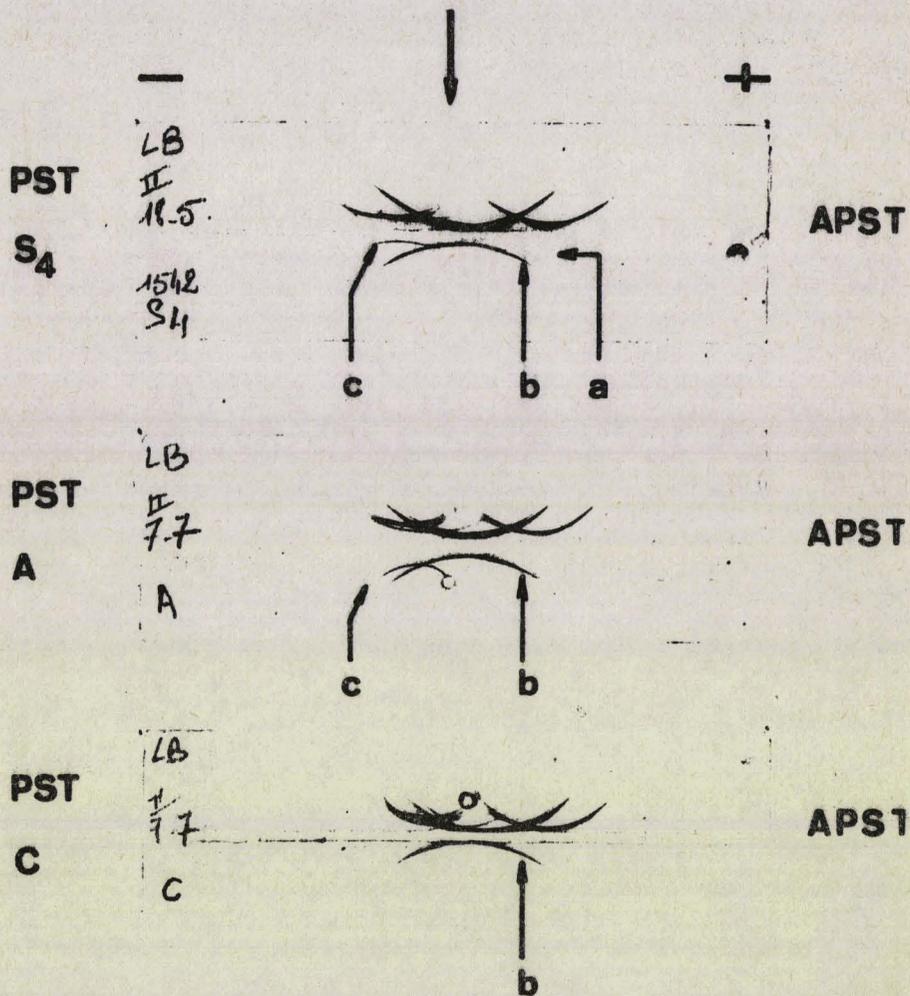


Figure 51

Immunoélectrophorèses de la Fraction S₄
 et des Fractions A et C Obtenues au cours de la
 Purification du S₄ par Chromatographie

PST : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf

A. PST : Immunsérum Anti-Protéines Solubles Totales



Tableau XXXII

Purification de S₄

Composition en Glucides des Fractions Obtenues

Désignation des Fractions*	Oses "Neutres" p. 100	Osamines p. 100	Acide Sialique p. 100	Oses —— Osamines	Oses —— Ac. Sialique
S ₄ **	11,5	8,2	7,5	1,4	1,54
A	12,24	8,6	8,0	1,41	1,54
B	2,51	1,36	1,21	1,85	2,08
C	15,6	11,0	10,35	1,42	1,52
D	2,7	1,41	1,12	1,92	2,4

(*) voir la Figure 49 (p. 182).

(**) voir Tableau XXI (p. 176).



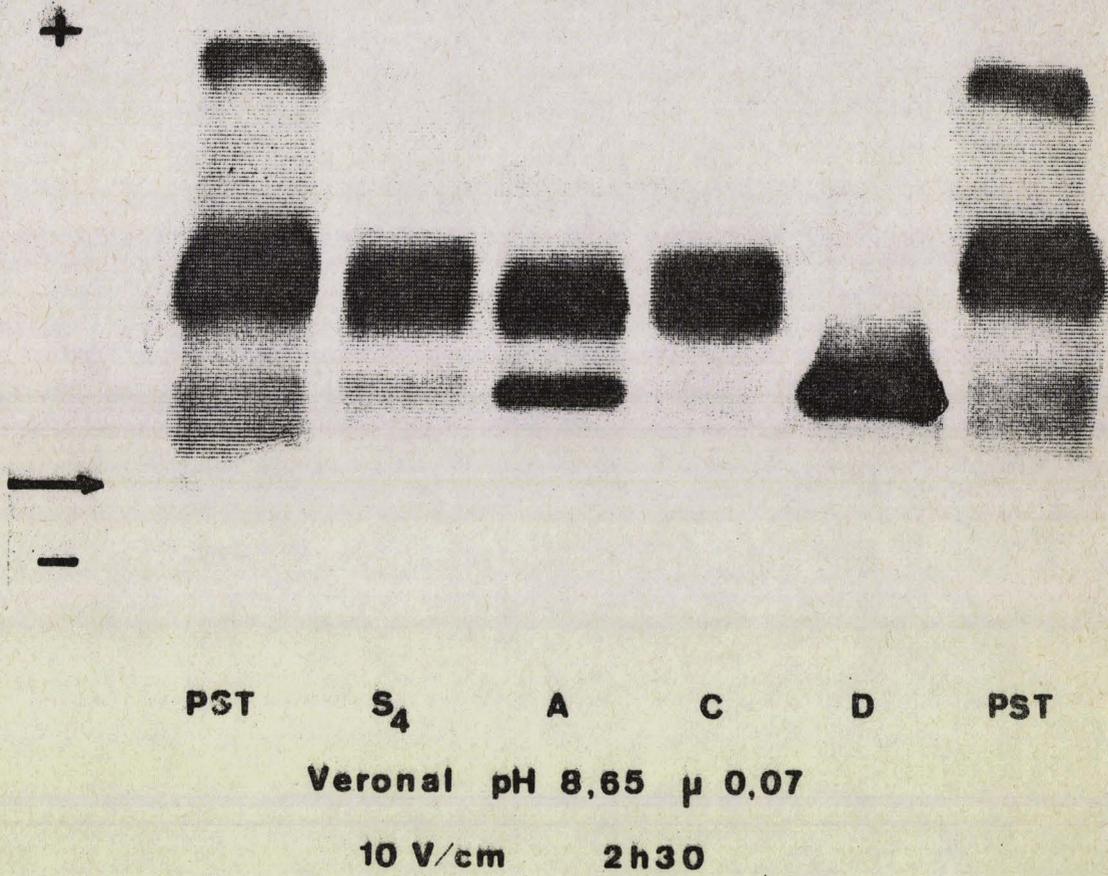


Figure 52

Electrophorèses sur Acétate de Cellulose
 Des Fractions Obtenues au Cours de la Rechromatographie du pic A
 sur CM - Cellulose

PST : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf

5. Quant à la fraction D, elle se présente après lyophilisation sous la forme d'une poudre légèrement teintée en rose, cela fait penser à la Transferrine. Son image électrophorétique (Figure 52, p. 187) montre qu'elle est relativement homogène. Sa composition en glucides (Tableau XXXII, p. 186) n'est pas très éloignée de celle qui est proposée par WILLIAMS (1962) (518), à propos de la transferrine du sérum de poule, constituant en tous points identique, selon l'auteur, à la transferrine présente dans le jaune d'oeuf (voir p. 80).

4° - CONCLUSIONS

1. Le procédé de fractionnement chromatographique, de la fraction S₄ que nous avons mis au point, résumé à la Figure 53 (p. 189), permet de préparer un constituant C, immunologiquement homogène. Le rendement bien que faible (175 mg à partir de 150 oeufs) peut être considéré comme acceptable.

2. Le composé C est une glycoprotéine, riche en glucides. Les compositions glucidiques comparées, données par les auteurs à propos du vitellomucoïde d'une part et celle du composé C, que nous avons obtenu d'autre part, sont rassemblées au Tableau XXXIII (p. 190). Notre composé C est plus riche en acide sialique que le vitellomucoïde (WILLIAMS - 1962) (519), (SEZILLE - 1964) (520). Sa teneur en osamines est voisine de celle du vitellomucoïde, donnée par ONOE (1936) (521). Par contre, pour ce qui est des oses "neutres", notre composé est moins riche, (15,6 %) que celui qui est étudié par ONOE (1936) (522).

Enfin, globalement notre composé C est plus riche en glucides (37 % de glucides totaux) que le vitellomucoïde décrit par ONOE (1936) (523) (30,3 %), ce dernier n'ayant pas dosé l'acide sialique.

3. La glycoprotéine que nous avons isolée, possède, en acétate de cellulose, une mobilité électrophorétique comparable, bien que légèrement inférieure, à celle de la 3 livétine. Cette mobilité est celle d'une α_2 globuline. Les auteurs (WILLIAMS - 1962) (524), (SEZILLE - 1964) (525), ont étudié le comportement électrophorétique du vitellomucoïde sur papier et en gel d'amidon. Il est donc difficile de comparer notre résultat aux leurs.

4. Aucun auteur n'a soumis le vitellomucoïde qu'il a préparé à l'immunoélectrophorèse. L'arc de précipitation que nous avons obtenu avec notre composé C, se situe au niveau des arcs 4 et 5 obtenus avec le mélange des protéines solubles totales. Cela confirme que la mobilité électrophorétique du composé C est celle d'une α_2 globuline. Il n'est toutefois pas possible d'identifier avec certitude l'arc obtenu à l'arc 4 ou l'arc 5.

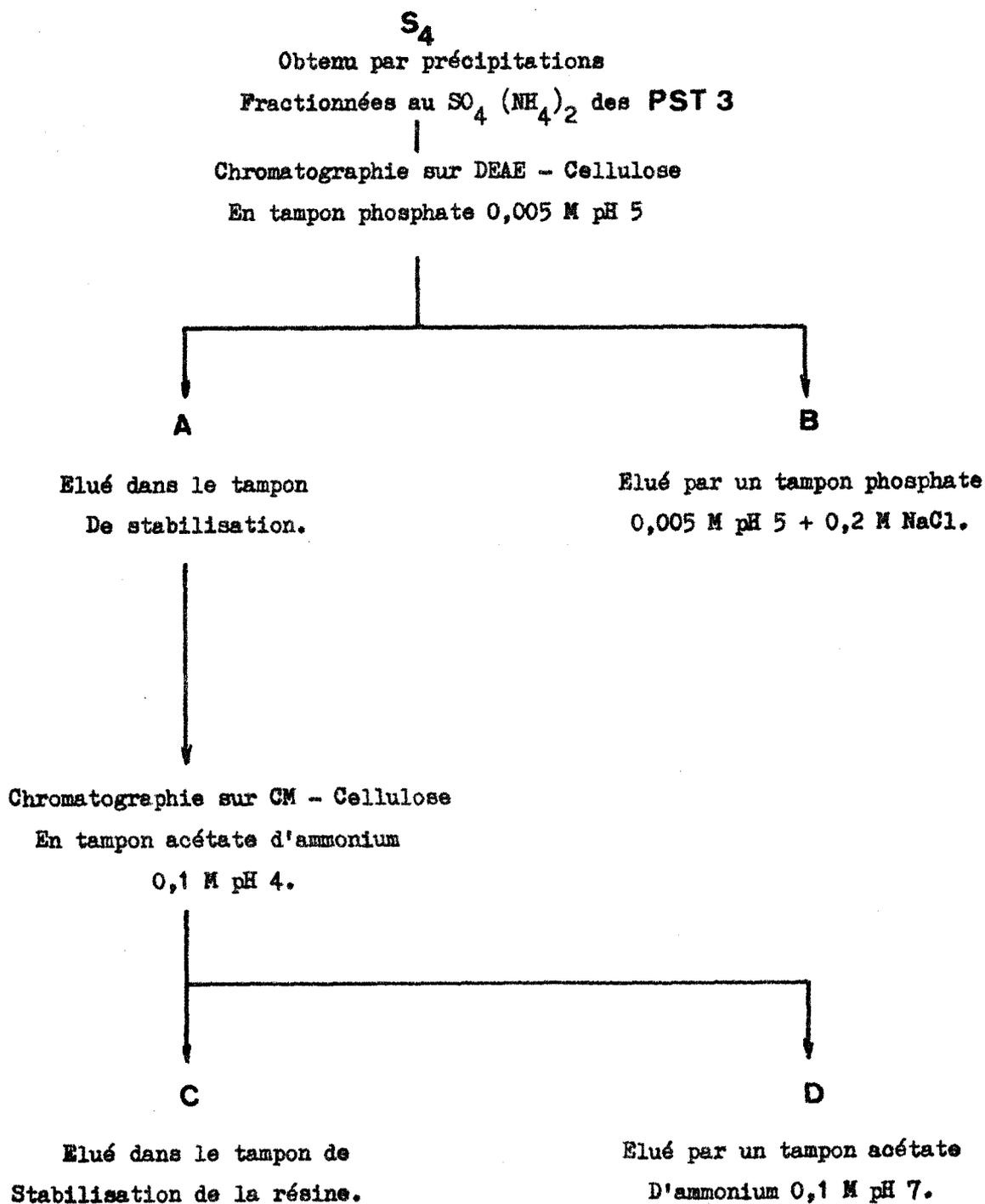


Figure 53

Purification chromatographique de la Fraction S₄

Tableau XXXIII
 Compositions Glucidiques Comparées du
 Vitellomucoïde et du Composé C

Glucides p/100	<u>Composé C</u>	Vitellomucoïde		
		<u>ONOE</u> (1936) (521)	<u>WILLIAMS</u> (1962) (519)	<u>SEZILLE</u> (1964) (520)
Oses "Neutres"	15,6	20,2 (Mannose)	7,8	11,5
Osamines	11,0	10,1 (Glucosamine)	5,5	-
Acide Sialique	10,35	-	2,0	4,3



5. La présence de la transferrine dans la fraction S_4 s'explique fort bien. En effet, WILLIAMS (1962) (526) a isolé la transferrine du jaune d'oeuf à partir du précipité obtenu en amenant les protéines solubles totales à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium. Notre fraction P_4 étant obtenue à une saturation inférieure il est donc logique que la transferrine se retrouve dans le S_4 .

6. De la même façon, lorsque la préparation du S_4 est faite sur les mélanges des protéines solubles totales, préparées par les méthodes 4 et 5 (PST - 4, PST - 5), plus riches en riboflavoprotéine, ce constituant se retrouve normalement dans la fraction S_4 . En effet, OSTROWSKI et Coll (1962) (527), ZAK et OSTROWSKI (1963) (528) ont préparé la riboflavoprotéine à partir du précipité obtenu en amenant les protéines solubles totales méthode 4 (PST - 4) à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium.

C - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT L'ISOLEMENT DU

CONSTITUANT C.

Le composé C que nous avons isolé à partir des protéines solubles totales du jaune et le vitellomucoïde décrit par les auteurs, possèdent en commun deux propriétés :

- Il s'agit dans les deux cas de glycoprotéines riches en glucides,
- Les mobilités électrophorétiques des deux constituants sont toutes deux comparables à celle de la β livétine.

III - ETUDE DU COMPOSE C

A - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

La purification chromatographique de la fraction S_4 , obtenue par précipitations fractionnées des protéines solubles totales du jaune, nous a permis d'obtenir un constituant immunologiquement homogène, dont le schéma immunoélectrophorétique ne comporte qu'un arc : b (voir p.185).

Nous avons cherché, dans un premier temps, à identifier cet arc de précipitation.

Par ailleurs, nous avons vu que la fraction A_1 , obtenue par chromatographie des protéines solubles totales sur CM - Cellulose, présente, lorsqu'il est réa-

lisé avec un immunosérum spécifique de cette fraction A_1 , un diagramme composé de deux arcs, dont un arc en position d' α_2 globuline. Nous avons fait réagir, dans un deuxième temps, notre composé C contre cet immunosérum.

1° - IDENTIFICATION DE L'ARC b

a) Mode Opératoire - Principe

Nous avons préparé un immunosérum anti-fraction S_4 (A. S_4).

Cette fraction contient trois constituants antigéniques : a, b, et c, par ordre de mobilité décroissante (voir p. 179). L'immunosérum obtenu contient donc trois anticorps : anti - a, anti - b, anti - c.

L'immunoélectrophorèse des protéines solubles totales (PST - 3) réalisée avec cet antisérum devait logiquement donner trois arcs, correspondant à ces trois constituants antigéniques.

En faisant réagir, après électrophorèse, les protéines solubles totales, d'une part contre l'immunosérum anti-protéines solubles totales, et d'autre part, contre cet immunosérum anti-fraction S_4 , on devait obtenir le raccordement des arcs correspondants et identifier les lignes a, b et c à 3 des 9 arcs du diagramme rapporté à la Figure 25 (p. 121).

b) Résultat - Conclusion

Le résultat que nous avons obtenu est donné à la Figure 54 (p. 193).

L'arc a est absent du diagramme obtenu en faisant réagir les protéines solubles totales contre l'immunosérum anti- S_4 (A. S_4).

Mais on peut observer que l'arc b se raccorde à l'arc 5 du schéma obtenu en faisant réagir les protéines solubles totales contre le sérum anti-protéines solubles totales.

On peut donc attribuer l'arc 4 à la livétine β et l'arc 5 au composé C, qui présente, nous l'avons vu, des analogies avec le vitellomucoïde.

2° - REACTION DU COMPOSE C CONTRE L'IMMUNSERUM ANTI- A_1

L'immunoélectrophorèse du constituant C isolé, réalisée avec l'immunosérum anti-fraction A_1 , est donnée à la Figure 55 (p. 194).

Nous voyons que le constituant C donne, avec cet immunosérum, une ligne de précipitation en position d' α_2 globuline.

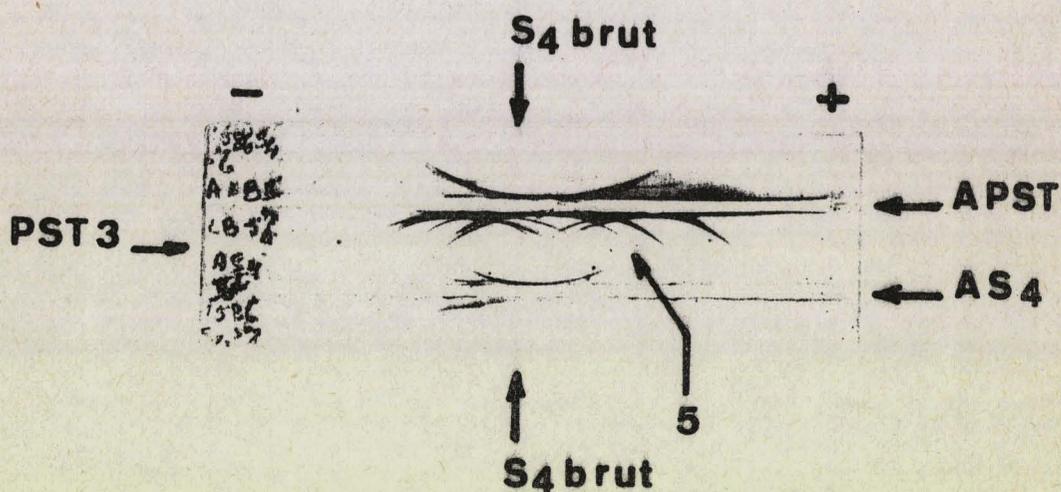


Figure 54

Identification de l'Arc de Précipitation du Composé C

PST - 3 : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf

A. PST : Immunsérum Anti-Protéines Solubles Totales

A. S₄ : Immunsérum Spécifique de la Fraction S₄

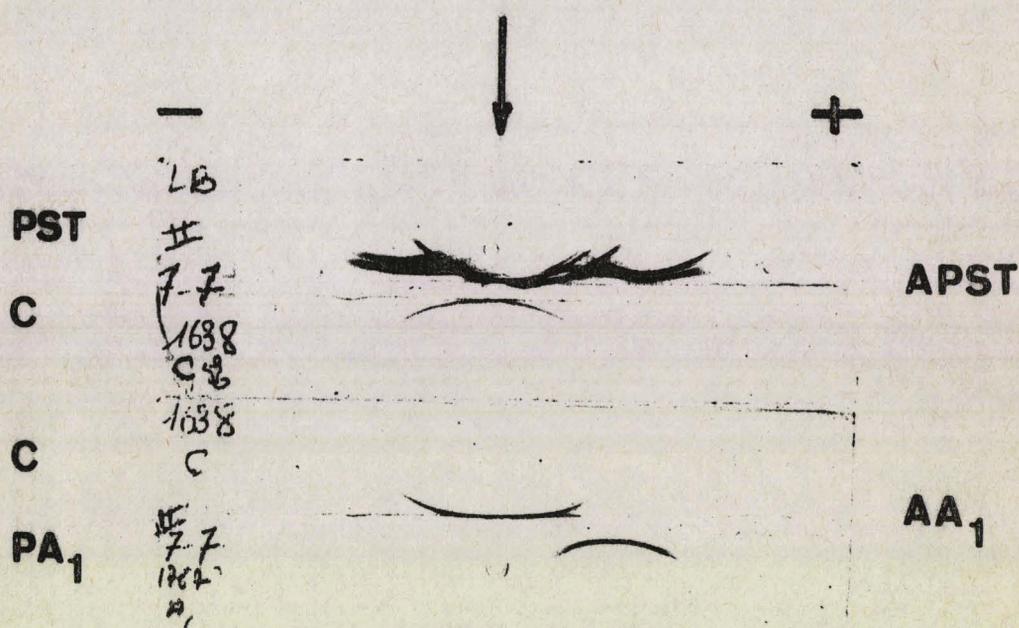


Figure 55

Réaction Immunologique des Composés C et PA₁
 Contre L'Immunsérum Anti-Fraction A₁ (A. A₁)

PST : Protéines Solubles Totales du Jaune d'Oeuf

A. PST : Immunsérum Anti-Protéines Solubles Totales.

Nous pouvons donc en déduire que le constituant C se trouve en mélange avec le constituant PA₁, dans la fraction A₁ isolée par chromatographie des protéines solubles totales sur CM - Cellulose. (voir p. 146).

Ce fait est d'ailleurs tout à fait logique, puisque le composé C n'est pas fixé sur la CM - Cellulose, dans la deuxième étape du procédé chromatographique de purification que nous avons décrit.

B - PROPRIETES PHYSIQUES

1° - PROPRIETES OPTIQUES

a) Absorption de la lumière

La courbe d'absorption de la lumière, réalisée en cuve de 1 cm de trajet optique, sur des solutions de protéide à 0,10 % dans l'eau à pH 7, présente un maximum d'absorption à 278 nm, dans l'ultra-violet, longueur d'onde à laquelle nous avons mesuré le coefficient d'extinction.

Nous avons trouvé, pour le composé C, la valeur de : $E_{278 \text{ nm}}^{1 \text{ p. } 100} = 3,4$.

b) Pouvoir Rotatoire Spécifique

La mesure a été effectuée à 546 nm, sur une solution à 800 mg de protéide pour 100 ml de tampon phosphate - citrate 0,1 M pH 6,5, à l'aide d'un micropolarimètre ZEISS. Dans ces conditions, nous avons obtenu pour le composé C la valeur de

$$(\alpha)_{546 \text{ nm}}^{22^\circ \text{ C}} = -30,0.$$

2° - POINT ISOELECTRIQUE

Le point isoélectrique a été déterminé par électrofocalisation en gel de polyacrylamide selon la technique décrite à la page 154.

Appliquée au composé C, l'électrofocalisation en gel conduit au résultat donné à la Figure 56 (p. 196). Le schéma obtenu présente plusieurs bandes de points isoélectriques compris entre 4,9 et 5,3.

3° - CONCLUSIONS

1. Selon ONOE (1936) (529) le pouvoir rotatoire spécifique du vitellomucoïde est de :

$$(\alpha)_D^{22} = -24,7^\circ.$$

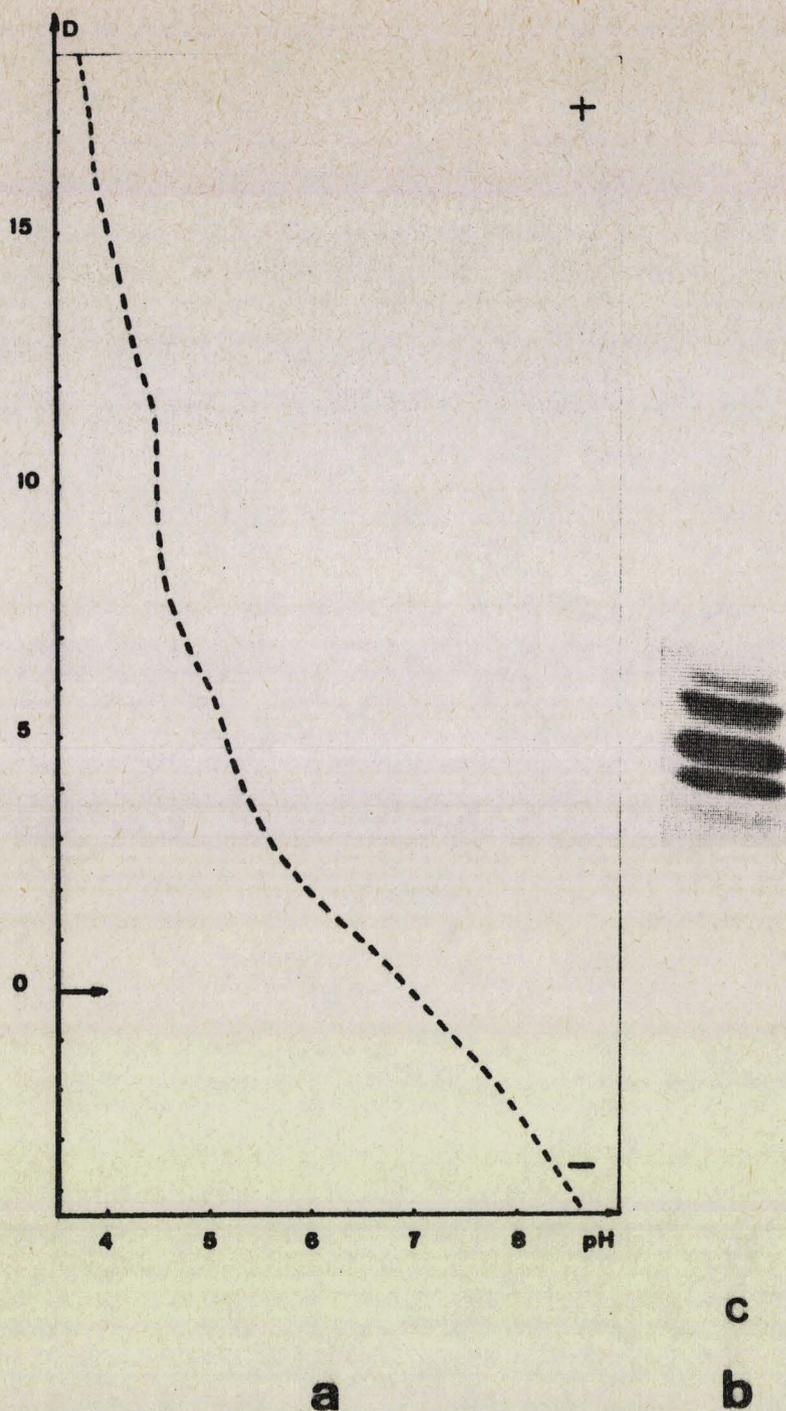


Figure 56

Electrofocalisation en Gel de Polyacrylamide du Composé C

a - Gradient de pH

b - Schéma Electrophorétique du Composé C

L'auteur ne précise pas la nature du tampon ayant servi à dissoudre le vitellomucoïde. La mesure a été faite avec la raie D du sodium, c'est à dire à une longueur d'onde de 589 nm.

Afin de pouvoir mieux comparer notre valeur avec celle de cet auteur, nous avons mesuré le pouvoir rotatoire spécifique du composé C à 578 nm, longueur d'onde la plus forte donnée par le micropolarimètre ZEISS. Nous avons trouvé :

$$(\alpha)_{578 \text{ nm}}^{22} = -26,2^{\circ},$$

Nous pouvons donc conclure que le pouvoir rotatoire spécifique de notre composé C est relativement proche de celui qui est donné par ONOE (1936) (530) à propos du vitellomucoïde.

2. L'électrofocalisation en gel permet de dire que le point isoélectrique du composé C est compris entre 4,9 et 5,3, ce qui donne comme valeur moyenne 5,1.

ONOE (1936) (531) propose pour le vitellomucoïde celle de 5,5, valeur voisine de celle que nous obtenons pour le composé C, par une technique tout à fait différente.

Les propriétés physiques étudiées, pour le vitellomucoïde et le composé C, que nous avons isolé, bien que fragmentaires, n'en permettent pas moins de rapprocher les deux constituants.

C - PROPRIETES CHIMIQUES

1° - TENEUR EN PHOSPHORE

a) Méthode

Le phosphore a été dosé, après minéralisation, par la méthode colorimétrique d'ALLEN (1940) (532).

b) Résultats

Le composé C renferme très peu de phosphore puisque nous avons obtenu la valeur de 0,03 %.

2° - COMPOSITION EN GLUCIDES

a) Méthodes

Les techniques de dosages utilisées sont les mêmes que celles qui ont été appliquées aux constituants à comportement préalbuminique (voir p. 158).

b) Résultats

1. Composition centésimale en glucides

Elle a été donnée au Tableau XXXII (p. 190) et nous l'avons reprise au Tableau XXXIV (p. 199).

2. Composition en oses neutres

Les résultats figurent au Tableau XXXIV (p. 199).

3° - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

a) Méthodes

Comme dans le cas des constituants à comportement préalbuminique, les acides aminés ont été déterminés, après hydrolyse chlorhydrique en tubes scellés, à l'auto-analyseur Beckman. Le tryptophane a été dosé simultanément avec la tyrosine par la méthode spectrophotométrique de GOODWIN et MORTON (1946) (533).

b) Résultats

La composition en acides aminés du composé C est donnée au Tableau XXXV (p. 200).

4° - CONCLUSION

Nous avons comparé plus haut la composition centésimale en glucides du composé C aux résultats donnés par les auteurs à propos du vitellomucoïde (voir Tableau XXXIII p. 190).

L'étude de la composition en ose est intéressante car elle montre que trois oses neutres entrant dans la composition de la molécule du composé C : le galactose, le glucose, la mannose, dans le rapport : 1 : 1 : 2. Le résultat est en parfaite concordance avec celui de (SEZILLE - 1964) (534) (voir p. 87).

Tableau XXXIV
Composition en Glucides du Composé C

Glucides p. 100	Composé C
<u>Composition Centésimale</u>	
Oses "Neutres"	15,6
Osamines	11,0
Acide Sialique	10,35
Oses Neutres/Osamines	1,42
Oses Neutres/Acide Sialique	1,52
<u>Composition en Oses Neutres</u>	
Galactose	3,9
Glucose	3,9
Mannose	7,8



Tableau XXIV
Composition en Acides Aminés du Composé C

Acides Aminés en g p. 100 g	Composé C
Acide Aspartique	6,58
Acide Glutamique	5,21
Arginine	2,31
Histidine	1,75
Lysine	6,51
Alanine	2,19
Cystine / 2	4,30
Glycocolle	1,15
Isoleucine	1,93
Leucine	2,55
Méthionine	0,57
Phénylalanine	2,08
Proline	1,51
Sérine	4,16
Thréonine	3,97
Tryptophanne	4,9
Tyrosine	5,10
Valine	4,05



La composition en acides aminés n'a pas été étudiée par les auteurs : remarquons toutefois, que le composé C contient de la cystine. Il diffère donc en cela du composé PA₁ que nous avons mis en évidence. Sa forte teneur en cet acide aminé (4,3 %) doit être rapprochée de la teneur en soufre de 2,6 % donnée par ONOE (1936) (535).

IV - CONCLUSION GENERALE CONCERNANT LE COMPOSE C

Après avoir mis en évidence, par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE - Cellulose des protéines solubles totales, une fraction riche en glucides, nous avons préparé la fraction S₄, par précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium. Cette fraction S₄ a été ensuite purifiée, par chromatographie et nous avons obtenu le composé C.

Le composé C est de nature glycoprotéinique, riche en glucides (37 % de glucides totaux). Il possède une mobilité électrophorétique, sur acétate de cellulose et en gelose (immunoélectrophorèse), comparable à celle d'une α_2 globuline, l'amenant au niveau de la β livétine.

Son pouvoir rotatoire spécifique, son point isoélectrique, pour les propriétés physiques, sa composition en oses neutres et sa richesse en cystine pour ce qui est des propriétés chimiques, permettent de rapprocher le composé C du vitellomucoïde décrit par ONOE (1936) (536), WILLIAMS (1962) (537) et SEZILLE (1964) (538).

Nous avons en outre identifié avec certitude l'arc de précipitation du composé C à l'arc 5 du diagramme immunoélectrophorétique des protéines solubles totales du jaune d'oeuf.

CONCLUSION GENERALE

Après avoir précisé l'hétérogénéité des protéines solubles totales du jaune d'oeuf, au moyen de l'électrophorèse et de l'immunoélectrophorèse, nous avons été amenés à étudier quatre constituants présents dans la fraction hydrosoluble du jaune d'oeuf.

Trois d'entre eux ont été signalés et décrits par les auteurs :

1. Pour ce qui est de la Riboflavoprotéine, nous avons confirmé certaines des données acquises. Toutefois, nous obtenons, pour ce composé, des teneurs en acide sialique et en phosphore supérieures à celles qui sont données dans la littérature. Il y aurait lieu de préciser ces deux points. Pour cela, la riboflavoprotéine, doit être purifiée, ce que nous n'avons pas réussi à faire.

2. Nous avons préparé la phosvitine et montré que le procédé mis au point par MECHAM et OLCOTT peut également conduire à un mélange des protéines solubles totales du jaune d'oeuf.

Nous avons étudié son comportement électrophorétique, en gel d'agarose et en gel mixte d'acrylamide - agarose, par rapport à ceux des protéines solubles totales et de la riboflavoprotéine. Pour cela, nous avons dû mettre au point une technique de coloration des électrophorégrammes au bleu de Toluidine.

3. Quant au vitellomucocide, nous l'avons obtenu dans un état de pureté convenable, afin d'en faire, par la suite, une étude plus détaillée. Néanmoins, nous avons précisé, le concernant, un certain nombre de données, en particulier sur sa nature glycoprotéinique et son comportement électrophorétique. Nous avons également identifié l'arc de précipitation de ce composé, dans le diagramme immunoélectrophorétique des protéines solubles totales du jaune d'oeuf.

L'étude que nous avons faite nous a enfin permis de caractériser un composé nouveau dans le jaune d'oeuf : PA₁. Il s'agit d'un constituant nettement individualisé, par sa nature et ses propriétés.

Les caractéristiques principales de ces quatre protéides sont rassemblées

Tableau XXXVI
 Propriétés Physiques et Chimiques
 de la Riboflavoprotéine, de la Phosvitine,
 du Constituant PA₁ et du Vitellomucoïde.

	Riboflavoprotéine	Phosvitine	PA ₁	Vitellomucoïde
E 1 p. 100 278 nm	11,5	6,0	1,4	3,4
(α) 22° 546 nm	- 47°5	- 57°5	- 31°25	- 30°0
Pi	4,0	4,75 - 5,1	3,8 - 4,0	5,1
<u>Composition Centésimale en</u>				
<u>Glucides</u>				
. Osés Neutres	5,8	2,6	28	15,6
Galactose	3,21	1,11	11,61	3,9
Glucose	0,51	0,38	2,52	3,9
Mannose	2,08	1,11	13,87	7,8
. Osamines		1,2	14,0	11,0
. Acide Sialique	3,85	1,7	15,7	10,35
<u>Composition en Acides</u>				
<u>Aminés</u>				
. Cystine	5,75	0	0	4,30
. Sérine	11,64	25,00	1,04	4,16
. Tyrosine	3,80	1,05	11,50	5,10
<u>Propriétés Particulières</u>	Fixe la Vitamine B ₂	Richesse en Phosphore		

au Tableau XXXVI (p. 203). Nous pensons poursuivre le travail entrepris, afin de le compléter.

Par ailleurs, l'étude bibliographique nous a appris que plusieurs constituants du sérum de la poule sont présents dans le jaune d'oeuf et plus particulièrement dans sa fraction hydrosoluble. Il paraît intéressant de reprendre le problème de cette filiation et d'essayer de l'étendre aux composés que nous avons isolés : vitellomucoïde et PA₁. Ce dernier, par sa nature glycoprotéinique et son comportement électrophorétique, qui est, en gelose, celui d'une α_1 globuline, présente une analogie certaine avec l'orosomucoïde. Nous essaierons donc de démontrer la présence de l'orosomucoïde de la poule dans le jaune d'oeuf, les techniques de fractionnement et d'analyse dont nous disposons devant nous permettre d'aboutir assez rapidement à un résultat.

B I B L I O G R A P H I E

- ABRAHAM S., HILLYARD L.A., CHAIKOFF I.L., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 89, 74, (147)
- AHMED K., JUDAH J.D., WALLGREN H., Biochem. Biophys. Acta., 1963, 69, 428, (295)
- ALDERTON G., FEVOLD H.L., Arch. Biochem. 1945, 8, 415, (60, 115)
- ALLEN R.J.L., Biochem. J. 1940, 34, 858, (485, 532)
- ALLERTON S.E., PERLMANN G.E., The Journ. of Biol. Chem. 1965, 240, N° 10, 3892, (269, 273, 278, 285, 288, 498, 501)
- AUGUSTINIAK J., MARTIN W.G., COOK W.H., Biochem. Biophys. Acta. 1964, 84, 721, (129, 149)
- AWDEH Z.L., WILLIAMSON A.R., ASKONAS B.A., Nature 1968, 219, 66, (478, 482)
- BAIN J.M., HALL J.M. Aust., J. Biol. Sci. 1969, 22, 653, 665, (4)
- BASU ROY CHOUDHURY R., REISER R., J. Nutrition 1959, 68, 457, (45, 48)
- BELITZ H.D., Z. Lebensmittelunters. Forsch. 1963, 119, 346, (261, 277)
- BELITZ H.D., Angew. Chem. Disch. 1964, 13, 574, (291)
- BELITZ H.D., Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 1965, 27, 341, (292)
- BELITZ H.D., Z. Lebensmittelunters. Forsch. 1966, 130, 12, (282, 293)
- BELLAIRS R., HARNESS M., HARKNESS R.D., J. Ultrastruct. Res. 1963, 8, 339, (3)
- BENÇZE W.L., SCHMID K., Analyt. Chem. 1957, 29, 1193, (387)
- BERNARDI G., COOK W.H., Biochim. Biophys. Acta. 1960, 44, 86, 253, 312, 445, (69, 81, 90, 167, 176, 197, 233, 251)
- BERNARDI G., COOK W.H., Biochim. Biophys. Acta. 1960, 44, 96, (73, 91, 97, 119)
- BLIGH E.G., DYER W.J., Can. J. Biochem. Physiol. 1959, 37, 911, (112, 145)
- BLUM J.C., L'oeuf de Consommation INRA, 17 et 18 Mars 1970, (49)
- BLUM J.C., Thèse Doct. 1966, (311, 324, 364, 452)
- BRAY D.J., KELLY M., Poult. Sci. 1966, 45, 1425, 26, (426)
- BUCKARD J., HAVAZ R., DAUTREVAUX M., Bull. Soc. Chim. Biol. 1966, XLVIII, N° 7, 851, (469)
- BULL, CURRIE, J. Am. Chem. Soc. 1946, 68, 742, (247)

- BURGI W., SCHMID K., J. Biol. Chem. 1961, 236, 1066, (345)
- BURLEY R.W., COOK W.H., Can. J. Biochem. Physiol., 1961, 39, 1295, (74, 98)
- CALDWELL R.C., PIGMAN W., Arch. Biochem. Biophys. 1965, 110, 91, 96, (467, 483)
- CALET C., Ann. Nutr. Alim. 1959, 13, A. 163 - A. 205, (43)
- CHARGAFF E., J. Biol. Chem. 1942, 142, 491, (59, 109, 114)
- CHARGAFF E., J. Biol. Chem. 1942, 142, 505, (297)
- CHI - CHING MOK, COMMON R.H., Can. J. Biochem. 1964, 42, 871, (184, 187, 226)
- CHI - CHING MOK, COMMON R.H., Can. J. Biochem. 1964, 42, 1119, (227)
- CLAMP J.R., DAWSON G., HOUGH C., Biochem. Biophys. Acta. 1967, 148, 342, (494)
- CLARK R.C., Biochem. J. 1970, 118, 537 - 42, (265, 270, 279, 283)
- CLAUSEN J., HEREMANS J., J. Immunol. 1960, 84, 128, (228)
- COMMON R.H., MOK C.C., Nature 1959, 183, 1811, (306)
- CONNELLY C., TABORSKY G., J. Biol. Chem. 1961, 236, 1364, (260)
- COOK W.H., Nature 1961, 190, 1173, (95, 131, 209, 249)
- COOK W.H., Ist. Intern. Congress of Food Science and Technology, Edit. J.M. LEITCH, 1962, Vol 1, 259, (75, 89, 94, 132, 162, 168, 198, 210, 234, 446)
- COOK W.H., BURLEY R.W., MARTIN W.G., HOPKINS J.W., Biochim. Biophys. Acta. 1962, 60, 98, (111, 120, 144)
- COPPOCK J.B.M., DANIELS N.W.R., GRESHAM G.A., HOWARD A.N., J. Athérosclérosis Res. 1962, 2, 139, (19, 50)
- DZIERZGOWSKI S.K., Ztschr. f. Bact. I. Abteil. 1901, 30, 2263, (215)
- EDMAN P., Acta. Chem. Scand. 1956, 10, 761, (348)
- EDWARDS H.M., Poult. Sci. 1964, 43, 751, (52)
- ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J. 1933, 27, 1824, (490)
- EVANS R.J., BANDEMER S.L., J. Agric. Fd. Chem. 1957, 5, 868, (84, 166)
- EVANS R.J., BANDEMER S.L., Poultry. Sci. 1961, 40, 597, (18, 24, 33, 103, 105, 110, 137)
- FEIGENBAUM A.S., FISCHER H., Arch. Biochem. Biophys. 1959, 79, 302, (44)
- FEVOLD H.L., Adv. Protein. Chem. 1951, 6, 187, 252, New-York Academic Press Inc. (2, 118)
- FEVOLD H.L., LAUSTEN A., Arch. Biochem. 1946, 11, 1, (61, 66, 127, 142)
- FISHER H., LEVELLE G.A., J. Nutrition, 1957, 63, 119, (16, 42)

- FLICKINGER R.A., ROUNDS D.E., *Biochim. Biophys. Acta.* 1956, 22, 38 (155)
- FOURNET B., *These Doct. Lille*, 1973, (495)
- FRAENKEL - CONRAT H., HARRIS J.I., LEVY A.L., *Methods Biochem. Anal.* 1952, 2, 359, (347, 388)
- GAGE S.H., FISCH P.A., *Ameri. J. Anat.* 1924, 34, I, (40)
- GOODWIN T.W., MORTON R.A., *Biochem. J.* 1946, 40, 628, (499, 533)
- GORINI I., LANZAVECCHIA G., *R.C. Ist. Lourbardo. B.*, 1955, 88, 951, (174, 196, 202, 515)
- GRABAR P., WILLIAMS C.A., *Biochim. Biophys. Acta.* 1955, 17, 67, 74, (360)
- GRANT C.T., TABORSKY G., *Biochemistry* 1966, 5, 544, (299)
- GREENGARD O., SENTENAC A., MENDELSON N., *Biochim. Biophys. Acta.* 1964, 90, 406, (272, 296)
- GRIZZUTI K., PERLMANN G.E., *Journ. Biol. Chem.* 1970, 245, N° 10, 2573, (290)
- HAGLUND H., *Methods of Biochemical Analysis*, 1971, vol 19, 1, Interscience - WILEY, (479)
- HARRAP F.E.G., *Analyst.* 1960, 85, 452, (258)
- HARRIS P.C., WILLOX F.H., *Poult. Sci.* 1963, 42, 178, 189, (51)
- HEALD P.J., *Ist Intern. Congress of Food Science and Technol. Leitch. Ed.* 1962, vol 1, 89, (308)
- HEALD P.J., Mc LACHLAN P.M., *Biochem. J.* 1963, 87, 571, (309)
- HEBERT J.P., *These Doct. Ing. Lille* 1972, (481)
- HIRS C.H.W., *J. Biol. Chem.* 1956, 219, 611, (341)
- HO C., MAGNUSSON J.A., WILSON J.B., MAGNUSSON N.S., KURLAND R.J., *Biochemistry*, Easton, 1969, 8, 2074, (264)
- HOPPE - SEYLER G.K.F., *Handbuch d. Physiol. U. Pathol. Chem. Analyse*, Berlin, 1865, 192, (57)
- HUI S.F., COMMON R.H., *Can. J. Biochem.* 1966, 44, 1357, 1364, (188)
- INOUE Y., NODA M., *Arch. Biochem. Biophys.* 1958, 76, 271, (31)
- ITO Y., FUTI T., *J. Biochem. Japan.* 1962, 52, 2, 221, 222, (99)
- JACQUOT R., ADRIAN J., *Ann. Nutri. Alim.* 1954, 8, 247, (9, 14, 424, 425, 429)
- JAKUBCZAK E., *These Doct. Lille* 1971, (1, 365, 459, 461, 503, 509)

- JAMES A.J., WEBB J.P.W., Butterworths Scientific, Publications Londres 1958 (17)
- JOUBERT F.J., COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.* 1958, 36, 389, (67, 71, 80, 232, 238, 255)
- JOUBERT F.J., COOK W.H., *Can. Journ. of Biochem. Physiol.* 1958, 36, 399, (245, 248, 289)
- JUKES T.H., *J. Biol. Chem.* 1933, 103, 425, (189, 191)
- JUKES T.H., FRASER D.T., ORR M.D., *J. Immunol.* 1934, 26, 353, 360, (216)
- JUKES T.H., KAY H.D., *J. Exp. Med.* 1932, 5, 81, 101, (217)
- KAMINSKI M., DURIEUX J. *Exp. Cell. Res.* 1956, 10, 590, (369)
- KAUCHER M., GALBRAITH H., BUTTON V., WILLIAMS H.H., *Arch. Biochem.* 1944, 3, 203, (10, 38)
- KAY H.D., MARSHALL P.G., *Biochem. J.* 1928, 22, 1264, (165, 169, 190)
- KAZAKOV K.S., *Uchenye Zapiski Kazan Gosudart, Vet. Inst;* 1956, 64, 199, (53)
- KLEMPERER F., *Arch. f. Exp. Path. U. Pharmacol.* 1893, 31, 356, (212)
- KNIGHT P.F., SCHECHTMAN A.M., *J. Exp. Zool.* 1954, 127, 271, (171, 180, 233, 433, 442)
- LARBIER M., BLUM J., GUILLAUME J., HARSCOAT J., *Ann. Hyg. Langue Française, Med. Nutr. Tours*, 1972, 12, N° 1, 125, (427)
- LASKOWSKI M., *Biochem. Z.* 1935, 278, 345, (152)
- LEA C.H., *Recent. Adv. in Food Science Ed.*, T.B. Hawthorn and R. mil Leitch 1962, vol 1, 92, London Butterworths.
- LEA C.H., HAWKE J.C., *Biochem. J.* 1952, 50, 67, 52, 105 (63)
- LEA C.H., RHODES D.N., STOLL R.D., *Biochem. J.* 1955, 60, 353, (28)
- LECLERCQ B., BLUM J.C., DELPECH P., *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 1969, 9, 191, (47)
- LEVENE P., ALSBERG C., *Z. Physiol. Chem.* 1901, 31, 543, (121)
- LEWIS J.C., SNELL N.S., HIRSCHMAN D.J., FRAENKEL - CONRAT H., *J. Biol. Chem.* 1950, 186, 23, (117, 275)
- LIVEWEAVER H., MORRIS H.J., KLINE L., BEAN R.S., *Arch. Biochem.* 1948, 16, 443, (419)
- MANDELES S., *J. Chromato.* 1960, 3, 256, (193, 507)
- MARTIN W.G., AUGUSTINIAC J., COOK W.K., *Biochim. Biophys. Acta.* 1964, 84, 714, (128)
- MARTIN W.G., COOK W.H., *Can. J. Biochem. and Physiol.* 1958, 36, 153, (72, 201, 208)

- MARTIN W.G., TATTRIE N.G., COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.* 1963, 41, 657, (100, 116, 137, 143)
- MARTIN W.G., VANDEGAER J.E., COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.* 1957, 35, 241, (172, 175, 200, 203, 205, 207, 221, 434)
- MAURER H.R., Ed. W. de Gruyter - 1971, 77, (471, 473)
- Mc CULLY K.A., COMMON R.H., *Can. J. Biochem. Physiol.* 1961, 39, 1451, (305)
- Mc CULLY K.A., MOK, COMMON R.H., *Can. J. Biochem. Physiol.* 1962, 40, 937, (87, 178, 257)
- Mc INDOE W.M., *Biochem. J.* 1959, 72, 153, (156)
- Mc INDOE W.H., *Biochem. J.* 1961, 80, 41, (241)
- Mc KINLEY W.P., OLIVER W.F., MAW W.A., COMMON R.H., *Prod. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1953, 84, 346, (83)
- Mc KINLEY W.P., OLIVER W.F., MAW W.A., COMMON R.H., Tenth world's Poultry Congress Section papers, Edinburgh, Scotland, 1954, 139, (153)
- MECHAM D.K., OLCOTT H.S., *Federation. Proc.* 1948, 7, 173, (235)
- MECHAM D.K., OLCOTT H.S., *J. Am. Chem. Soc.* 1949, 71, 3670, (230, 236, 244, 246, 250, 252, 266, 271, 274, 284, 286, 294, 462, 463, 474, 486)
- MEDUSKY J., *Bull. Aca. Polo. Sci.* 1958, 6, 455, (54)
- MOK C.C., COMMON R.H., *Can. J. Biochem.* 1964, 42, 871, (431, 444, 448, 450)
- MOK C.C., GRANT C.T., TABORSKY G., *Biochemistry* 1966, 5, N° 8, 2517-23, (262)
- MOK C.C., MARTIN W.G., COMMON R.A., *Can. J. Biochem. Physiol.* 1961, 39, 109, (268, 281, 307)
- MONTREUIL J., SPIK G., *Microdosage des Glucides Fascicule I, Methodes Colorimétriques de dosage des glucides totaux.* Lille 1963 (411, 438, 440, 487, 491)
- MORTON R.K., *Methods in Enzymology*, (Academic Press. N.Y.) 1955, vol 1, 40, (240)
- NACE G.N., *J. Exp. Zool.* 1953, 122, 423, (222)
- NEEDHAM J., *Chemical Embryology III*, Cambridge University Press. 1931, (417)
- NEEDHAM J., *Biochemistry and Morphogenegis*, Cambridge University Press. 1942, (418)
- NEELIN J.M., COOK W.H., *Proc. Can. Fed. Biol. Socs.* 1960, 3, 41, (280)
- NEELIN J.M., COOK W.H., *Can. J. Biochem. Physiol.* 1961, 39, 1075, (125, 126, 146)
- OLIVE J.P., *Alim. et Vie.* 1968, 56, N° 7, 159-69, (8)

- ONOE T., J. Biochem. Tokyo, 1936, 24, 1, (391, 392, 393, 395, 397, 399, 402, 403, 407, 408, 409, 414, 436, 505, 514, 521, 522, 523, 529, 530, 531, 535, 536)
- OSBORNE T.B., CAMPBELL G.F., J. Am. Chem. Soc. 1900, 22, 413, (58, 164)
- OSTROWSKI W., KRAWCZYK A., Acta. Chem. Scand. 1963, 17, 241, (329)
- OSTROWSKI W., ZAK Z., KRAWCZYK A., Acta. Biochim. Biophys. Acta. 1962, 59, 515, (310, 313, 315, 317, 322, 330, 351, 415, 485 bis, 527)
- OSTROWSKI W., ZAK Z., KRAWCZYK A., Acta. Biochim. Polon. 1968, 15, 241, (319, 321, 332, 334, 337, 339, 346, 349, 353, 356, 366, 484, 496, 497, 500, 502, 504)
- OUCHTERLONY O., Arkiv. Chem. Mineral Geol. 1948, 26 B N° 19, (362)
- PARKINSON J., Sci. Food. Agr. 1966, 17, 101, 111, (96)
- PATTERSON R., Fed. Proc. 1961, 20, 379, (224)
- PLIMMER R.H.A., J. Chem. Soc. 1908, 93, 1500, (163)
- PLIMMER R.H.A., SCOTT F.H., J. Chem. Soc. 1908, 93, 1699, (108)
- POSTERNAK T., WAECELL P., Helv. Chim. Acta. 1964, 47, 1575, (124)
- POULIK M.D., Nature, Lond. 1957, 180, 1477, (182, 376)
- PRIVETT O.S., BLANK M.L., SCHMIDT J.A., J. Fd. Sci. 1962, 27, 463, (25, 35)
- RABINOWITZ M., LIPMANN F., J. Biol. Chem. 1960, 235, 1043, (298)
- RADOMSKI M.W., COOK W.H., Can. J. Biochem. 1964, 42, 395, 406, (242)
- RADOMSKI M.W., COOK W.H., Can. J. Biochem. 1964, 42, 123, (243)
- RAMON G., C. R. Soc. Biol. 1928, 99, 1473, (213)
- RAMON G., C. R. Soc. Biol. 1928, 99, 1476, (214)
- RAPPAPORT M., LEONIS J., Chromatographie-Symposium II. 1962, 143, (194, 475, 508)
- REISER R., J. Nutrition 1951, 44, 159, (23)
- RENNERT O.M., Nature, 1967, 213, N° 5081, 1133, (470)
- RHODES M.B., AZARI P.R., FEENEY R.E., J. Biol. Chem. 1958, 230, 399, (476)
- RHODES M.B., BENNET N., FEENEY R.E., J. Biol. Chem. 1959, 234, 2054, (454, 457, 458)
- RHODES D.N., LEA C.H., Nature 1956, 177, 1129, (29, 41)
- RHODES D.N., LEA C.H., Biochem. J. 1957, 65, 526, (30)
- RIDDLE O., J. Morphol. 1911, 22, 455, (6)
- RIMINGTON Biochem. J. 1931, 25, 1062, (489)

- ROEPKE R.R., BUSHNELL L.D., *J. Immun.* 1936, 30, 109, 113, (218)
- ROMANOFF A.L., ROMANOFF A.J., John Wiley and Sons 1949, (5, 428)
- ROSENSTEIN R.W., TABORSKY G., *Biochemistry*, 1970, 9, N° 3, 649, (300)
- SAITO Z., MARTIN W.G., *Can. J. Biochem.* 1965, 44, N° 3, 293, (422)
- SANGER F., THOMPSON E.O.P., *Biochem. J.* 1953, 53, 353, (344)
- SAVAGE D.J., THOMPSON C.C., *J. Inst. Brew.* 1971, 77, N° 4, 371, 375, (480)
- SCHECHTMAN A.M., *J. Exp. Zool.* 1947, 105, 329, (219)
- SCHEIDEGGER J.J., *Int. Arch. Allergg.* 1955, 7, 103, (186, 361)
- SCHJEIDE O.A., *Progress in the Chemistry of Fats and other lipids* (HOLMAN Ed.)
Pergamon Press N.Y., 1963, 6, 253, (104, 160)
- SCHJEIDE O.A., URIST M.R., *Science* 1956, 124, 1242, (157, 301)
- SCHJEIDE O.A., URIST M.R., *Exp. Res.* 1959, 17, 84, (68, 134, 158, 303)
- SCHJEIDE O.A., URIST M.R., *Nature*, 1960, 188, 291, (159)
- SCHJEIDE O.A., URIST M.R., Mc LEAN F.C., *Endocrinology* 1958, 63, 570, (302)
- SCHONENBERGER M., KELLNER, SUDHOFF H., HAUPT H., *Hoppe-Seyl. Z.* 1958, 309, 145, (380)
- SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R., HAUPT H., *Biochem. Z.* 1958, 329, 490, (381)
- SEZILLE G., *These Doct. 1er sujet. Lille*, 1964, (12, 13, 20, 26, 34, 37, 39, 56, 88,
101, 106, 113, 138, 140, 148, 161)
- SEZILLE G., *These Doct. 2ème sujet Lille* 1964, (183, 192, 259, 396, 401, 405, 412,
413, 439, 451, 465, 466, 506, 513, 517, 520, 525, 534, 538)
- SEZILLE G., BISERTE G., *C.R. Seance Soc. Biol.* 1964, 158, 1092, (21)
- SHEPARD C.C., HOTTLE G.A., *J. Biol. Chem.* 1949, 179, 349, (62, 76, 170, 173, 195,
199, 220, 432, 437)
- SKELLON J.H., WINDSOR D.A., *J. Sci. Food and Agric.* 1962, 13, 300, 302, (46)
- SMITHIES O., *Biochem. J.* 1955, 61, 629, (181, 375)
- SPACKMAN D.H., STEIN W.H., MOORE S., *Analyt. Chem.* 1958, 30, 1190 (340, 386)
- SPIES J.R., CHOMBERS A.R., *Analyt. Chem.* 1948, 20, 30, (342)
- SPOHN A.A., RIDDLE O. *Ann. J. Physiol.* 1916, 41, 397, (7)
- STEVEN F., *Nature Lond.* 1961, 192, 972, (85)
- SUGANO J., *Biochem. (Tokyo)* 1957, 44, 205, (65, 78)

- SUGANO H., J. Biochem. Japon, 1958, 45, 393, (237)
- SUGANO H., J. Biochem. Tokyo, 1959, 46, 417, (79)
- SUGANO H., WATANABE I., J. Biochem. (Japon), 1961, 50, 473, (136)
- SUNDARARAJAN T.A., SAMPATH KUMAR K.S.V., SARMA P.S., Biochim. Biophys. Acta. 1960, 38, 360, (239, 256, 267)
- SVENNERHOLM L., Biochim. Biophys. Acta. 1957, 24, 604, (382)
- SWIGEL M.M., POSTERNAK, Cr. Seance Soc. Biol. 1927, 184, 909, (122)
- SWIGEL M.M., POSTERNAK T., Cr. seance Soc. Biol. 1927, 185, 615, (123)
- TABORSKY G., ALLENDE C.C., Biochemistry 1962, 1, 406, (276)
- TABORSKY G., MOK C.C., J. Biol. Chem. 1967, 242, 1495, (263)
- TATTRIE N.H., J. Lipids Res. 1959, I, 60, (32)
- TATTRIE N.H., COOK W.H., London Society of Chemical Industry, SCI Monograph N° 32, 1968, (27, 36, 82, 93, 102, 107, 130, 139, 141, 150, 151)
- TERROINE F.F., BELIN P., Bull. Soc. Chim. Biol. 1927, 9, 1074, (15)
- TILLMANS J., PHILIPPI K., Biochem. Z. 1929, 215, 36, (488)
- TSUJI F.J., BRIN M., WILLIAMS H., Arch. Biochem. Biophys. 1955, 56, 290, (55)
- TUNMAN P., SILBERZAHN H., Z. Lebensmittelunters. Forsch. 1962, 116, 340, (287)
- URIEL J., Bull., Soc. Chim. Biol. 1966, 48, N° 8,9, 969, 982, (441)
- VAN ARKEL O. BALLIEUX R.E., JORDAN F.L.J., J. Chromato. 1963, 11, 421, (468, 472)
- VANDEGAER J.E., REICHMAN M.E., COOK W.H., Arch. Biochem. Biophys. 1956, 62, 328, (64, 70, 231)
- VANSTONE W.E. MAW W.A., COMMON R.H., Can. J. Biochem. Physiol. 1955, 33, 891, (154)
- WALBORG E.F., CHRISTENSSON L., GARDELL S., Analyt. Biochem. 1965, 13, 177, (335)
- WALLAOE R.A., Anal. Biochem. 1965, 11, 297, (92)
- WARNER R.C., The Proteines, vol II, Academic Press Inc. N.Y. 1954, 435, (229)
- WEBER M., ZAK Z., OSTROWSKI W., Folia Biologica (Krakov) 1966, 14, 357, (336, 354, 358, 363, 367)
- WERNER I., ODIN L., Upsala Lakare Foreminger Fohrenliger, 1949, 54, 69, (492, 510)
- WERNER I., ODIN L., Acta. Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230, (493, 511)
- WILLIAMS J., Biochem. J. 1962, 83, 346, (179, 185, 204, 206, 211, 225, 370, 394, 398, 400, 404, 406, 410, 430, 443, 447, 449, 512, 516, 519, 524, 537)

WILLIAMS J., Biochem. J. 1962, 83, 355, (371, 372, 373, 374, 377, 378, 379, 383, 385, 389, 421, 518, 526)

WILLIAMS J., Biochem. J. 1968, 108, 57, (384, 390)

WRIGLEY C.W., Science Tools. 1968, 15, 17-23 (477)

ZAK Z., OSTROWSKI W., Acta. Biochim. Polon. 1963, 10, 427, (314, 316, 318, 323, 326, 328, 331, 333, 338, 343, 350, 352, 368, 416, 435, 453, 455, 456, 528)

ZAK Z., WEBER M., OSTROWSKI W., Bull. Soc. Chim. Biol. 1968, 50, N° 4, 795, (320, 325, 327, 355, 359)

ZAK Z., STECZKO J., OSTROWSKI W., Bull. Soc. Chim. Biol. 1969, 51, N° 6, 1065, (357)

