

Étude des protéines des graines d'une légumineuse : Lablab niger Medik

Autor(en): **Miège, M.N.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences [1948-1980]**

Band (Jahr): **23 (1970)**

Heft 1

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-739136>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

ÉTUDE DES PROTÉINES DES GRAINES D'UNE LÉGUMINEUSE: *LABLAB NIGER* Medik

PAR

M. N. MIÈGE

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	79
INTRODUCTION	83
<i>Chapitre premier. MATÉRIEL ET MÉTHODES</i>	85
<i>Chapitre 2. ETUDES DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES PROTÉINES COTYLÉDONAIRES.</i>	88
1. Influence de la durée d'extraction	88
2. Influence de la dilution	89
3. Influence de l'action successive de plusieurs solvants, bilan d'une extraction totale.	90
4. Influence de la force ionique	96
5. Influence du pH des solvants.	96
6. Influence de l'ordre d'entrée en action des deux solvants eau, solutions salines.	98
7. Influence de la durée de conservation de la farine	98
8. Influence de l'âge de la graine et révélation d'un rythme endogène.	104
<i>Chapitre 3. ANALYSE ET FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS</i>	107
I. <i>Fractionnement de l'extrait protéique</i>	107
II. <i>Sensibilité propre de chaque famille aux diverses influences.</i>	109
1. Nature et proportions des différentes familles protéiques solubilisées aux principales étapes d'une extraction	109
2. Nature et proportion des protéines dont la solubilité est affectée par la conservation de la farine	110
3. Efficacité comparée des dialyses et électrodialyses	111
III. <i>Substances phosphorées et glucidiques accompagnant les protéines en solution</i>	112
1. Influence des composés phosphorés sur la solubilisation des protéines par l'eau	112
2. Elimination de la phytine et des glucides accompagnant les protéines en solution	114
<i>Chapitre 4. ETUDE DES FAMILLES PROTÉIQUES</i>	116
I. <i>Analyse des familles protéiques</i>	116
1. Facteurs affectant la précipitation des pseudo-globulines	116
2. Constitution des familles protéiques	118
3. Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique des familles protéiques	119

a) albumines	116
b) pseudoglobulines	119
c) globulines	123
II. <i>Fractionnement des familles protéiques</i>	124
1. Fractionnement des globulines par voie chimique	124
2. Fractionnement des familles protéiques par chromatographie sur DEAE cellulose	124
a) famille globulinique	125
b) famille albuminique	126
<i>Chapitre 5. ETUDE DES PROTÉINES DE L'AXE GERMINATIF.</i>	129
I. <i>Caractéristiques du germe</i>	129
II. <i>Extractions et fractionnement des protéines</i>	131
1. <i>Bilan d'une extraction totale.</i>	131
2. <i>Substances phosphorées et glucidiques accompagnant les protéines en solution.</i>	133
III. <i>Etude des familles protéiques.</i>	136
1. <i>Analyse des familles</i>	136
a) <i>constitution</i>	136
b) <i>analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique</i>	137
2. <i>Fractionnement des familles</i>	137
a) <i>albumines</i>	138
b) <i>globulines</i>	139
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	142

RÉSUMÉ

Ce travail est une étude des protéines solubles dans l'eau et les solutions salines des graines de *Lablab niger*. Les deux parties de la graine, cotylédons et axe germinatif, sont analysées séparément et comparativement.

1. *Solubilité.* L'étude des facteurs pouvant exercer une influence sur la solubilisation des protéines a conduit à déterminer les conditions optimales d'extraction et a permis, en outre, de révéler une fluctuation des caractères de solubilité. Selon que l'extraction a lieu sur farine fraîchement moulue ou conservée après mouture, le taux d'azote solubilisé dans le premier extrait aqueux pourra varier, toutes conditions égales par ailleurs, de 55 à 22% de l'azote total de la farine. Ceci est dû à la solubilisation par l'eau d'une grande partie des globulines qui normalement ne sont dissoutes que par des solvants d'une certaine force ionique. Ce serait une association avec les substances phosphorées qui conférerait à ces globulines ce caractère inhabituel d'hydrosolubilité; mais cette association instable ne serait pas préservée dans la farine. Les globulines d'une farine conservée ne sont plus hydrosolubles mais sont intégralement extraites par leur solvant propre, les solutions salines (ici de force ionique au moins égale à 0,68).

2. *Analyse des extraits cotylédonaires; isolement et analyse des familles protéiques.* Par l'intervention successive des 3 solvants: eau, solutions de chlorure de sodium à 4%, soude 0, 1N, 98% de

l'azote total de la farine de cotylédons passe en solution. Les globulines et albumines représentent 80 % de l'azote extrait. Les albumines sont hétérogènes à l'électrophorèse (agarose). Il fut montré que les pseudoglobulines ne correspondent pas à une famille déterminée. Elles seraient en fait des albumines instables.

A chaque fraction albuminique, riche en glucides et stable, semble correspondre une fraction pseudoglobulinique pauvre en glucides et instable mais de même comportement électrophorétique et antigénique. Les globulines fournissent des diagrammes électrophorétiques très différents de ceux des albumines, apparemment plus simples, cependant les immunoélectrophorétochromes révèlent plusieurs entités confondues dans la tache majeure. Albumines et globulines furent fractionnées par chromatographie sur cellulose anionique.

3. *Protéines de l'axe germinatif*. L'axe est 2 fois plus riche en azote et 4 fois plus riche en phosphore que les cotylédons. Il contient des lipides présents seulement à l'état de traces dans les cotylédons. Il renferme moins de glucides totaux mais 2 fois plus de sucres solubles. Il existe dans l'axe une famille protéique absente dans les cotylédons: les prolamines. La quantité d'azote non extrait après épuisement par les 3 solvants utilisés est supérieure à celle observée chez les cotylédons (6 % contre 1,4 %). Le taux de phytine des extraits, bien qu'inférieur à celui des extraits cotylédonaires, est loin d'être négligeable. La constitution et les caractéristiques des albumines et globulines de l'un et l'autre organe ont été comparées. Les diagrammes électro et immunoélectrophorétiques révèlent que les protéines de l'axe germinatif se distinguent de leurs homologues cotylédonaires par une plus grande complexité des albumines et une plus grande simplicité des globulines.

SUMMARY

This is a study on the water—and salt—soluble proteins of *Lablab niger* seeds. Cotyledons and germinative axis are analysed separately and comparatively.

1. *Solubility*. A study of the factors which might influence the solubilisation of the proteins led to settling optimal conditions of extraction and, furthermore, underlined the fluctuations of the solubility characteristics. The amount of dissolved nitrogen in a first water extract may vary—conditions being equal—from 55-22 % of the total nitrogen of the flour, according to extraction taking place on fresh milled flour or flour which was stocked after milling.

This is due to solubilisation by water of a major part of the globulins which usually require salt—solutions to be dissolved.

Association with phosphorus-containing substances might confer to the globulins unusual water solubility but this unstable association would not be preserved in the flour. Globulins from stocked flour are no longer water soluble, they are however entirely extracted by their own solvent i.e. salt solutions (ionic strength of 0.68).

2. *Analysis of cotyledon-extracts. Isolation and analysis of protein groups*. By the successive action of three solvents: water, 4 % sodium chloride and 0.1 N sodium hydroxide, 98 % of the total nitrogen content of the cotyledon-flour is dissolved. Globulins and albumins account for 80 % of the extracted nitrogen. Electrophoresis shows heterogeneity of the albumins (agarose). It was shown that the pseudoglobulins were not a well defined group, but could be unstable albumins. To each stable albumine fraction, rich in glucids, seems to correspond an unstable pseudoglobulin fraction, poor in glucids, both fractions having the same electrophoretic and antigene behaviour. The electrophoretic patterns shown by globulins are very different from those shown by albumins, they seem to be more simple but immunelectrophoresis shows several entities marged with the major spot. Chromatographic separation of albumins and globulins was carried out on DEAE cellulose.

3. *Proteins from the germinative axis*. The axis is twice as rich in nitrogen and four times as rich in phosphorus as the cotyledons—further the axis contains less total glucides but is twice as rich in

soluble sugars. Prolamines, which are totally absent from the cotyledons, are present at a small amount in the axis. After exhaustive extraction by the three above-mentioned solvents, the non-extracted nitrogen content is higher in the axis than in the cotyledons (6% against 1,4%). The phytin content of the extracts, although inferior to that of cotyledons extracts, is far from negligible.

Constitution and characteristics of albumins and globulins of both organs were compared. The electro- and immuno-electrophoretical patterns revealed that the proteins of the germinative axis differ from those of the cotyledons in their more complex albumins and simpler globulins.

ZUSAMMENFASSUNG

Dieses ist eine Studie der wasserlöslichen und salzlöslichen Proteine der Samen von *Lablab niger*. Die beiden Teile des Samens, Keimblätter und Keimachse, wurden einzeln und vergleichend analysiert.

1. *Löslichkeit.* Die Studie der Faktoren, die einen Einfluss auf die Löslichkeit der Proteine ausüben können, führte uns dazu, die Optimalbedingungen der Extraktion zu bestimmen und zeigte weiterhin eine Fluktuation der Löslichkeitseigenschaften. Je nachdem ob die Extraktion aus frisch gemahlenem oder aus nach dem Mahlen aufbewahrtm Mehl stattfindet, kann der Anteil des gelösten Stickstoffs bei sonst unveränderten Bedingungen zwischen 55 und 22% des totalen Stickstoffgehaltes des Mehles schwanken. Dieser Umstand beruht auf der Wasserlöslichkeit eines grossen Teiles der Globuline, die normalerweise nur durch Lösungsmittel eines gewissen Ionisierungsgrades in Lösung gebracht werden. Für diese ungewöhnliche Wasserlöslichkeit der Globuline ist wahrscheinlich ihre Assoziation mit Phosphorverbindungen verantwortlich. Im Mehl bleibt aber diese instabile Assoziation nicht erhalten. Die Globuline des aufbewahrtm Mehles sind nicht mehr wasserlöslich, sie werden aber vollständig extrahiert durch ihr eigenes Lösungsmittel, d. h. durch Salzlösungen (Ionenstärke mindestens 0.68).

2. *Analyse der Kotyledonarextrakte, Isolierung und Analyse der Proteingruppen.* Durch nacheinanderfolgende Einwirkung von drei Lösungsmitteln: Wasser, Kochsalzlösung 4% und 0.1 Natriumhydroxydlösung werden 98% des totalen Stickstoffgehaltes des Keimblattmehls in Lösung gebracht. 80% des extrahierten Stickstoffs stammen von den Globulinen und Albuminen. Die Albumine erwiesen sich bei der Elektrophorese (Agarose) als heterogen. Es wurde nachgewiesen, dass die Pseudoglobuline nicht einer bestimmten Gruppe angehören. Sie scheinen in Wirklichkeit instabile Albumine zu sein. Jeder glucidreichen, stabilen Albuminfraktion scheint eine glucidarme, instabile Pseudoglobulinfraktion mit gleichem elektrophoretischem und antigenem Verhalten zu entsprechen. Die Globuline liefern Elektrophoresediagramme, die sich von jenen der Albumine stark unterscheiden. Sie sind scheinbar einfacher, doch enthüllen die Immunelektrophoretogramme die Anwesenheit verschiedener Komponenten im Hauptfleck. Albumine und Globuline wurden chromatographisch auf DEA-Zellulose fraktioniert.

3. *Proteine der Keimachse* Die Achse ist zweimal reicher an Stickstoff und viermal reicher an Phosphor als die Keimblätter. Sie enthält Lipide, die in den Keimblättern nur sparsam vorkommen. Sie enthält gesamthaft weniger Glucide, ist jedoch doppelt so reich an löslichen Zuckern. Eine der in der Achse vorkommenden Eiweissgruppen fehlt den Kotyledonen völlig: die Prolamine. Der Reststickstoffgehalt nach vollendeter Extraktion durch die drei verwendeten Lösungsmittel ist höher als bei den Kotyledonen (6% gegen 1,4%). Der Phytin Gehalt der Extrakte, ist zwar niedriger als bei den Kotyledonen, aber durchaus nicht unbeträchtlich. Konstitution und Eigenschaften der Albumine und Globuline der beiden Organe wurden verglichen. Die elektro- und immunelektrophoretischen Diagramme zeigten, dass die Proteine der Keimachse sich von jenen der Keimblätter unterscheiden, indem die Albumine komplexer, die Globuline dagegen einfacher sind.

AVANT-PROPOS

L'intérêt scientifique que présente l'étude des protéines des graines fut mis en relief par Osborne (1924) voici une cinquantaine d'années. L'application des techniques modernes a donné à cette discipline de nouvelles dimensions; une mise au point des résultats obtenus fit l'objet d'une première conférence internationale en 1963.

Tout travail sur les protéines de graines est jalonné d'étapes tout à fait générales dont les deux principales sont d'abord l'extraction, puis l'analyse et le fractionnement des extraits.

Des ouvrages généraux traitent la plupart des problèmes concernant ces protéines (Altschul et al., 1966; Brohult et Sandegren, 1965; Haurowitz, 1963; Joung, 1963; Pace, 1955; Stewart et Thompson, 1954); en outre, des contributions particulières ont fait l'objet d'un grand nombre de publications. Avant d'aborder une étude sur les protéines de graines, une mise au point sur les définitions est nécessaire. La première étape du travail étant l'extraction à l'aide de solvants appropriés, une classification reposant sur les caractères de solubilité semble s'imposer. C'est en effet sur cette base qu'Osborne (1924) édifia la première nomenclature. Elle a l'avantage de la simplicité et, de ce fait, est encore le plus souvent utilisée. Son grand défaut est, bien sûr, le manque de précision. Ainsi que le souligne Danielson (1956), « des résultats divergents dans certains travaux expérimentaux proviennent de malentendus dans les définitions ». Récemment, Baudet et Mossé (1962) ont déploré ces confusions. « On trouve rarement », disent-ils, « plusieurs auteurs qui ont suivi le même processus d'extraction pour préparer la même protéine ». Or, Briggs et Mann (1950) ont isolé intentionnellement une glycinine (globuline de soja) par plusieurs méthodes et ils ont pu montrer que chaque préparation fournissait un électrophorogramme différent. Ainsi, souvent, des dénominations communes sont attribuées à des familles qui sont loin d'être rigoureusement identiques. Danielson (1956) remarque, par exemple, que les globulines de diverses sources végétales exigent pour être solubilisées des solutions de forces ioniques différentes.

La classification d'Osborne ne peut donc que servir de cadre à une classification plus rigoureuse. C'est la connaissance des caractères physico-chimiques des protéines qui permettra l'établissement de nomenclatures précises.

La préoccupation majeure qui doit présider à l'extraction est celle du maintien de l'organisation macro-moléculaire; or, les divergences qui ont souvent opposé des auteurs travaillant sur le même sujet étaient fréquemment dues à des dénaturations provoquées au cours de l'extraction et du fractionnement.

Dans de nombreux cas, les auteurs ont travaillé sur les protéines à température ambiante. Cet usage, particulièrement répandu dans les recherches sur les graminées, s'impose dans ce cas par le faible rendement d'extraction obtenu aux basses tempé-

ratures, comme l'ont montré Mossé et Baudet (1963). Quensel (1942a, b), après avoir commencé ses travaux sur l'orge à 4° C, les continua à température ambiante à cause de la faible solubilité des globulines à basse température. Djurthoft (1962) travailla à basse température mais en utilisant, en compensation, de très longues durées d'extraction (16 à 20 h.).

Depuis longtemps déjà, l'action néfaste de températures élevées avait été dénoncée. Urion et al. (1944) ont constaté, de façon inattendue, et en contradiction avec ce qui est communément trouvé sur les graminées, une diminution du rendement d'extraction des protéines d'orge parallèle à l'augmentation de température; ils imputent ce fait à la dénaturation dont sont responsables les températures élevées. Kretovitch (1954) met en garde contre la dénaturation de protéines à propriétés enzymatiques préparées selon le procédé d'Osborne.

Si la température accélère tous les processus de dénaturation, que penser alors de l'intervention de solvants chauds parfois utilisés pour délipider les graines oléagineuses (arachides, cucurbitacées...) et même des graines à teneur en matières grasses peu élevée (orge)? Si certains auteurs ont douté des effets néfastes d'une extraction au solxhlet, Danielson (1956) a dénoncé cette pratique trop souvent en vigueur. Actuellement, d'ailleurs, il est possible d'éliminer les lipides par des méthodes beaucoup moins dénaturantes. Mondovi et al. (1964) en décrivent plusieurs.

En ce qui concerne les dicotylédones, et les légumineuses en particulier, le problème de la température peut être résolu beaucoup plus aisément. Nagel et al. (1938) constatent, lors de l'extraction des protéines de soja, qu'un abaissement de la température de 28° à 1°5 n'entraîne pas une diminution de rendement supérieure à 8%.

Les autres facteurs intervenant au cours de l'extraction ne semblent pas avoir préoccupé de très nombreux chercheurs. Sur le *Lablab niger*, Narayanamurti et al. (1930) ont montré que 20 minutes d'agitation sont aussi efficaces que 6 heures. Mais il semble que peu d'auteurs aient réalisé comme l'ont fait Mossé, Baudet et al. (1963-1964-1965-1966) sur le blé, une étude générale systématique très approfondie de l'influence de tous les facteurs agissant au cours de l'extraction. Cette étude leur a permis la mise au point d'un protocole d'extraction optimum leur permettant ensuite l'analyse détaillée des protéines extraites.

L'étape suivant l'extraction est l'élimination des substances non protéiques compagnes. Parmi elles, la phytine a gêné de nombreux auteurs qui ont cherché à s'en débarrasser.

Helliot et Machebœuf (1947), travaillant sur l'arachide, pensent que la phytine existe dans la graine sous forme indépendante et ne se lie aux protéines qu'au cours de l'extraction et des séparations successives, constituant alors des complexes qui souillent les fractions protéiques. Par contre, Bourdillon (1951), après avoir extrait des graines de *Phaseolus* une protéine qui cristallise en combinaison avec l'acide phytique, admet que le complexe phytine-protéine est préexistant dans la graine.

Smith et al. (1955-1957) estiment que l'élimination préalable de la phytine est une étape indispensable de l'étude des protéines individuelles. Rondelet et Lontie (1953) écartent, pour éliminer la phytine, le relargage au sulfate d'ammonium à cause, notamment, des longues dialyses que ce procédé entraîne. Perles (1962), après avoir noté le rôle inhibiteur que joue la phytine unie à un enzyme, constate que la combinaison phytine-protéine est dissociée par relargage à 0° C: la protéine précipite, l'acide phytique reste en solution et s'élimine alors aisément. Cette dernière méthode semble judicieuse pour se débarrasser à la fois de phytine éventuelle et des autres substances non protéiques dissoutes telles que les sucres. Danielson (1956) a mis l'accent sur l'importance de l'élimination, dès les premières étapes de séparation, de toutes les substances non protéiques, ces dernières pouvant agir par la suite comme colloïdes protecteurs et rendre les séparations plus difficiles. La tendance actuelle met en garde cependant contre un acharnement excessif à purifier.

Les familles protéiques complexes, après avoir été isolées, doivent être fractionnées en entités homogènes mieux définies.

Barre et Labat (1962) sont pessimistes quant à l'isolement de fractions pures et pensent « qu'il est rare qu'une fraction protéique, même bien différenciée et soigneusement isolée, ne contienne pas quelque satellite agrégé à la molécule ».

Lors de l'individualisation et de la caractérisation des fractions, il faut éventuellement déceler les systèmes « d'association et de dissociation » réversibles, ce phénomène étant sous la dépendance de facteurs bien déterminés: le pH et la force ionique. De tels systèmes ont été mis en évidence fréquemment, notamment sur l'arachide par Johnson et al. (1950*a, b, c*), sur le pois par Kretovitch (1954), sur le lupin par Joubert (1955), sur les cucurbitacées par Anderson et al. (1960*b*).

Une connaissance de plus en plus précise de la complexité des familles protéiques est rendue possible grâce aux perfectionnements croissants des techniques mises en jeu: électrophorèses, chromatographies, immunoélectrophorèses. (Elton, 1962*a, b*; Enari, 1961-1962-1964; Evans et al., 1962; Fox et al., 1963-1964; Gherke et al., 1964; Gijzel et al., 1961; Kloz et al., 1959; Landry et al., 1965-1966; Moureaux, 1966; Weintraub, 1964; Woychik et al., 1960-1961).

La combinaison de ces techniques a permis à divers chercheurs de proposer de nouveaux systèmes de nomenclature des protéines. Ainsi, Oh et Gehrke (1965) combinent comportement chromatographique sur C.M. cellulose et mobilité électrophorétique sur gel d'amidon pour établir une classification des protéines du blé. Dechary et al. (1961) utilisent la chromatographie sur D.E.A.E. cellulose pour différencier les protéines d'arachide. Thombs (1965) propose une classification des mêmes protéines sur la base de leur migration en gel de polyacrylamide. Grabar et al. (1960-1962-1964) appliquent l'immunoélectrophorèse à l'étude des changements physiologiques que subissent les fractions protéiques au cours du maltage, ce qui a conduit récemment les brasseurs à adopter une nomenclature des protéines de l'orge

basée sur la mobilité électrophorétique et la spécificité immunologique proposées par Grabar. En conservant l'avantage de ces séparations rigoureuses, Altshul et al. (1964) veulent en outre tirer parti des distinctions fondamentales fournies par l'aspect biologique des protéines. Ils prônent l'utilisation d'un élément commun servant de base à la classification. Cet élément ce sont les « Aleurines » terme par lequel Altshul désigne les grains d'aleurone et les corps protéiques, et ce sont les protéines de ces organites qui lui serviront de base de classification: l'isolement des aleurines précédant l'extraction des protéines qu'ils contiennent.

L'une des applications de l'analyse et du fractionnement des protéines des graines est l'utilisation des données fournies à des fins taxonomiques. Nous passons en revue (Miège 1968) les résultats obtenus dans ce domaine.

Par ailleurs, liée à l'analyse des protéines de graines, l'étude de leurs caractères physiologiques a soulevé des controverses. Plusieurs auteurs, par exemple, dont Danielson (1956), dénie aux globulines toute action physiologique, confinant cette famille dans un simple rôle de réserve et reconnaissent les seules albumines comme physiologiquement actives. Kretovitch et al. (1954) ne sont pas de cet avis et, après avoir décelé les activités enzymatiques chez la vicilline, la légumine (globulines) et la léguméline (albumine) de pois, concluent que ces graines sont dépourvues de réserves strictes, c'est-à-dire n'ont aucune protéine métaboliquement inactive. Evans et al. (1962), pour attribuer aux globulines un strict rôle de réserve, se basent sur le fait que, lors de la germination (ici de l'arachide), les teneurs en globulines sont les premières à diminuer. Danielson (1951) constate, sur le pois, que la digestion des globulines est très intense au début de la germination, notamment lors de l'apparition des premières feuilles, alors que les albumines sont dégradées beaucoup plus lentement. Il en tire la même conclusion qu'Evans.

Les transformations que subissent les protéines lors de la maturation de la graine (Bressani et al., 1961; Kloz et al., 1966; Sayanova, 1965) ainsi que l'étude de leur distribution intracellulaire (Altschul 1961; Bagley et al., 1963; Bills et al., 1963; Dieckert et al., 1962; Duvick, 1955-1961-1963; Graham et al., 1962-1963; Haurowitz, 1963; Urion et al., 1944*a, b*;) aident à mieux comprendre l'aspect biologique de leur rôle. Mais, de ce point de vue, il semble que les deux parties de la graine doivent avoir des destinées et des actions différentes et il devrait être d'un grand intérêt d'étudier séparément, d'une part les protéines de l'axe germinatif, d'autre part celles des cotylédons ou de l'albumen. Cette recherche paraît n'avoir pas encore été réalisée sur les dicotylédones. Danielson (1951) a analysé comparativement les constituants globuliniques de l'albumen et de l'embryon de certaines graminées en séparant mécaniquement ces deux organes lors de la mouture. Cependant, la séparation la plus rigoureuse, la séparation manuelle, n'a encore été le point de départ d'aucune étude approfondie et, jusqu'à présent, sur les dicotylédones, aucun travail général ne semble avoir été réalisé sur les protéines de cotylédons d'une part, de l'axe d'autre part.

INTRODUCTION

Nous avons entrepris l'étude générale des protéines des graines d'une légumineuse africaine: le *Lablab niger Medik.* (= *L. vulgaris* (L) *savi* = *Dolichos lablab* L.)

Le choix de notre matériel a été guidé par l'importance nutritionnelle toute particulière que présente la dolique dans les régions soudano-sahéliennes d'Afrique. D'autre part, le décorticage facile de ses graines, leur absence presque totale de lipides qui s'accompagne d'une haute teneur en azote et d'une très forte proportion de protéines solubles dans l'eau et les solutions salines, en faisaient un matériel de choix pour l'étude que nous nous proposons de poursuivre. Ajoutons enfin que, grâce aux sélections pratiquées sur cette plante au Centre de Recherches agronomiques de Bambey¹, nous avons la possibilité de travailler sur des graines provenant de lignées pures (n° 58.21 de Bambey).

Dans une première étape, nous avons étudié les conditions d'extraction des protéines cotylédonaire, testant tous les facteurs pouvant influencer la solubilisation de ces protéines; un protocole d'extraction optimum fut ainsi établi.

Un extrait aqueux brut total fut ensuite analysé afin de déterminer la nature et les proportions de ses constituants (protéiques ou non). Alors furent isolés des extraits les familles protéiques définies par leurs caractères de solubilité. Après avoir étudié les caractéristiques de ces familles, en particulier leur teneur en azote, phosphore et sucres, leur complexité fut révélée par l'établissement de diagrammes électrophorétiques, chromatographiques, immunoélectrophorétiques.

C'est alors que les protéines furent extraites des axes germinatifs par application du protocole mis au point sur les cotylédons. Le matériel disponible était en effet très peu abondant, 3 kilos de graines ne fournissent que quelques grammes d'axes, aussi les essais appliqués à ce matériel devaient être réduits aux plus intéressants. Les familles isolées des extraits furent analysées; les caractéristiques des familles homologues cotylédonaire et de l'axe, ainsi que les diagrammes reflétant leurs constitutions furent comparés, en particulier à l'aide de tests immunologiques. De ces comparaisons furent tirées un certain nombre de conclusions et de considérations générales.

Rappelons la définition des termes désignant les trois familles protéiques dont nous aurons à parler. Les caractéristiques classiques de ces familles sont données par Joung (1963) au chapitre 1 du traité général de Florkin et Stotz.

Albumines :

- protéines solubles dans l'eau distillée et les solutions salines diluées,
- précipitables par le sulfate d'ammonium à saturation,

¹ Nous remercions vivement MM. Sauget, directeur du C.R.A. de Bambey et Tardieu, chef du service de génétique, qui nous ont fourni très aimablement ce matériel.

- non précipitables par le sulfate d'ammonium à demi-saturation,
- coagulables par la chaleur et d'autres agents dénaturants.

Pseudoglobulines :

- protéines solubles dans l'eau distillée et les solutions salines diluées,
- précipitables par les solutions de sulfate d'ammonium aux environs de la demi-saturation,
- coagulables par la chaleur et d'autres agents dénaturants.

Globulines :

- protéines insolubles dans l'eau distillée,
- solubles dans les solutions salines diluées,
- précipitables par les solutions de sulfate d'ammonium aux environs de la demi-saturation,
- coagulables par la chaleur et d'autres agents dénaturants.

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les graines furent triées immédiatement après la récolte, pour éliminer celles qui présentaient des traces d'attaque d'insectes, puis décortiquées; axes et cotylédons séparés furent stockés en congélateur à -10° . Au moment de l'emploi, le matériel fut broyé au moulin Willey (200 mesh). A partir de ce moment, toutes les manipulations: extraction, centrifugations, dialyses, électrodialyses... furent conduites à $+2^{\circ}$ C en chambre froide.

D'une manière générale, la mise en solution fut effectuée par agitation douce, pendant des temps déterminés, de la suspension farine solvant. Trois solvants ont été utilisés: eau distillée, chlorure de sodium à 4% et soude 0,1 N.

Après chaque extraction, le résidu insoluble fut séparé du solvant par centrifugation à 30 000 g pendant une demi-heure¹.

Chaque fois que le schéma expérimental l'a exigé, nous avons éliminé des solutions obtenues les composés à faible poids moléculaire, soit par dialyse, soit par électrodialyse dans des broyeurs de viscose. Dans ce dernier cas les tensions utilisées étaient de l'ordre de 200 V ce qui permettait de ramener, par exemple, la durée d'élimination du sulfate d'ammonium de 5 jours à 12 heures. Cette élimination fut testée sur les eaux du dialyse par le réactif de Nessler.

Lors de la réalisation de certains schémas, nous avons systématiquement dosé, à chaque étape de l'extraction, l'*azote total* et l'*azote protéique*. Qu'il s'agisse de la farine elle-même ou des extraits, ces deux grandeurs ont été estimées après minéralisation sulfurique en présence des catalyseurs de Dumazert et Marcellet, par la méthode colorimétrique de Nessler, les réactifs étant préparés selon Koch et McMeekin (1924). En ce qui concerne la farine, nous n'avons pas tenté, lors de la mise en route des diverses expériences, d'amener les différents lots obtenus à partir du stock de cotylédons congelés au même degré d'humidité car la dessiccation de la farine entraînait une diminution systématique de solubilité, les caractéristiques de la farine furent déterminées sur une aliquote au début de chaque expérience.

Corrélativement à ces mesures, nous avons, dans certains cas, évalué le *poids de protéines* contenues dans les extraits, avant ou après dialyse, soit par pesée après

¹ Dans de nombreux extraits un léger trouble surnageait, après centrifugation, dont il était impossible de se débarrasser autrement que par filtration; aussi avons-nous introduit dans le protocole normalisé une filtration rapide sur papier succédant à la centrifugation. Les volumes utilisés dans les calculs étaient ceux mesurés avant filtration.

dessiccation à 110° du précipité obtenu en présence d'acide trichloracétique 1,5 N, soit par pesée de parties aliquotes desséchées à 110° des solutions dialysées.

Lors de certaines expériences, la quantité totale de *sucres* extraite en même temps que les protéines solubles a été mesurée, après hydrolyse, par la méthode de Sorensen et Haugaard exposée par Staub (1963). Les dosages de *phosphore* total ont été effectués par application de la technique de Delsal et Maunouri proposée par Bertrand (1963). Le phosphore minéral a été évalué directement sans minéralisation préalable.

Les pesées de précision ont été effectuées à l'aide d'une balance Mettler au 5/100 de mg. Lors de prélèvements ou de déterminations de poids secs, l'enceinte de la balance était maintenue anhydre à l'aide de godets contenant de l'anhydride phosphorique renouvelé dès que nécessaire.

Pour les analyses électro- et immunoélectrophorétiques, divers milieux furent essayés. Le papier s'est révélé être peu satisfaisant. L'acétate de cellulose, tout en donnant de meilleurs résultats, ne fournissait pas une aussi bonne résolution que les gels d'agar et d'agarose. Dans ces deux milieux, la résolution est sensiblement identique mais l'agarose présente sur l'agar l'avantage de supprimer le courant d'endosmose. Le gel de polyacrylamide fut également essayé, mais la perte de la simplicité de la technique n'est pas compensée par une meilleure résolution, aussi avons-nous finalement adopté comme milieu le gel d'agarose. La technique utilisée fut celle décrite par Grabar (1960, 1963) en y apportant la modification imaginée par Masseyeff (1959) concernant le dépôt de l'échantillon. Les tensions appliquées furent choisies de manière à obtenir une intensité de 68 mA pour 4 lames, ce qui correspondait sensiblement à 110 V. Après 30 minutes de migration, les protéines étaient dénaturées par une immersion de 15 minutes dans l'acide acétique à 10% saturé d'acide picrique puis séchées et enfin colorées au noir amide. Les courbes densitométriques des diagrammes obtenus furent réalisées à l'aide d'un densitomètre enregistreur « Densicord Photovolt » et les proportions relatives des fractions furent établies par intégration des surfaces à l'aide d'un intégrateur « Photovolt ».

Les *immunoélectrophorèses* furent effectuées selon la technique de Grabar (1960-1964)¹.

Pour la préparation des immunserums, deux lapins furent immunisés pour chacune des familles protéiques des cotylédons et de l'axe.

Les *chromatographies* furent faites sur colonnes de D.E.A.E. cellulose; divers tampons et gradients furent utilisés. La teneur en protéine des fractions recueillies fut évaluée par mesure; au spectrophotomètre Beckmann D.B., de la densité optique à 280 m μ . Les solutions protéiques, avant d'être déposées sur la colonne, étaient dialysées contre le tampon de début d'éluion. Pour les globulines, la dialyse était arrêtée au point de précipitation commençante.

¹ Nous remercions très vivement M. le professeur Masseyeff et le D^r Gombert qui nous ont initiée à ces techniques, ainsi que le professeur Giono grâce auquel les prélèvements de sérum purent être effectués dans les meilleures conditions.

Dans les premières expériences, les essais ont été effectués en grand nombres. Les écarts étant faibles et la probabilité, pour qu'il y ait une différence significative, élevée, les essais ont alors été limités à une seule répétition.

Les résultats consignés dans les tableaux représentent la moyenne des deux essais. Quand des défauts de reproductibilité ont été constatés, des recherches furent entreprises pour en déterminer les causes. C'est ainsi que certains facteurs, dont l'influence sur la solubilité des protéines était insoupçonnée, ont été révélés.

CHAPITRE 2

ÉTUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES PROTÉINES COTYLÉDONAIRES

Les caractéristiques générales de la farine seront précisées comparativement pour chacune des deux parties de la graine dans la chapitre 4. Signalons seulement que 4,4% du poids sec des cotylédons est constitué par de l'azote dont nous cherchons, dans ce chapitre, à extraire la plus grande quantité possible.

1. *Influence de la durée d'extraction*

Des prises de 2 g de farine ont été agitées avec 50 ml d'eau à 2° C pendant des périodes variant de 5 à 60 minutes. Le tableau 1 montre que la totalité de ce qui peut être extrait l'est au bout de 5 minutes de contact entre la farine et le solvant.

TABLEAU 1

Pourcentage d'extraction en fonction du temps de contact farine-solvant à 2° C

Temps d'agitation	5 min.	15 min.	30 min.	60 min.
N total de l'extrait aqueux en % de N total de la prise d'essai	58,1	58,0	57,5	56,0

La légère diminution constatée, pour le taux d'extraction, proportionnelle à la durée d'extraction, et se manifestant au delà de 15 minutes, correspond vraisemblablement à un début de précipitation des cryoprotéines.

Les protéines précipitables réversiblement par le froid sont bien connues dans le monde animal. Zigman et Lermans (1964), par exemple, ont montré que le phénomène, constaté chez certains mammifères, d'opacification du cristallin pour des températures inférieure à 10° C, était dû à la précipitation, à cette température, d'une fraction importante des protéines de cet organe. Chez les végétaux, la cryoprécipitation réversible a également été constatée pour les protéines de certaines familles. Ghetie et Buzila (1962) signalent ce phénomène dans les graines de Légumineuses, Cucurbitacées, Rosacées et Crucifères.

Nous même avons observé l'existence de cryoprotéines dans notre matériel. Un séjour de 10 minutes en réfrigérateur d'un extrait limpide provoque l'apparition d'un précipité blanc qui disparaît dès le retour à une température plus élevée. Le seuil de précipitation se situerait aux alentours de 5°. Il y a ici une incohérence: l'extraction ayant lieu à 2° C il semble que ces cryoprotéines ne devraient pas être extraites, or elles le sont. En effet, l'extrait obtenu après 5 minutes d'agitation à 2° C suivie de 30 minutes de centrifugation toujours à 2° C, d'abord limpide se trouble s'il est maintenu quelques temps à basse température. La précipitation des cryoprotéines ne serait donc pas instantanée mais progressive et ce phénomène pourrait expliquer la légère baisse de rendement liée à l'augmentation de la durée d'extraction.

Cette cryoprécipitation est réversible: dès le retour à une température supérieure à 10° la solution troublée redevient limpide.

La conclusion de cet essai est évidente: il faut réduire la durée d'agitation au minimum efficace, c'est-à-dire 5 minutes.

2. *Influence de la dilution*

Nous appelons dilution le rapport volume de solvant en ml/poids de farine en g.

Dans cette expérience, 6 prises d'essai de farine, de poids variant de 0,4 à 16 g, sont agitées pendant 5 minutes dans un même volume d'eau distillée (20 ml), ce qui fournit des dilutions respectivement de 50 — 25 — 12,5 — 5 — 2,5 et 1,25. Les valeurs obtenues sont ramenées d'une part au volume de solvant introduit, d'autre part au volume d'extrait recueilli ce qui permet d'obtenir, dans le premier cas, la quantité d'azote théoriquement extraite, dans le second cas, la quantité pratiquement extraite.

L'examen de la figure 1 révèle une diminution du rendement pratique parallèle à la diminution relative de la quantité de solvant par rapport à la prise d'essai. Ce fait laisserait à penser que le volume exerce une influence limitante sur la mise en solution des protéines de la farine par saturation. Or, les valeurs du rendement théorique montrent qu'au contraire la proportion d'azote extrait — mais non récupéré — varie en fonction inverse du volume de solvant.

Le fort rendement théorique aux faibles dilutions laisse supposer que la richesse en électrolytes du premier extrait aqueux serait telle que certaines globulines passeraient en solution en même temps que les albumines alors que, pour des dilutions élevées, ces mêmes globulines ne seraient pas solubilisées.

La diminution de rendement pratique proportionnelle à la diminution de volume de solvant est due à la rétention, par la farine, d'une partie de l'extrait d'autant plus importante que la dilution est plus faible. Cette fraction des protéines solubilisées et retenues devrait pouvoir être récupérée par des extractions aqueuses successives. Dans ce cas, les variations des rendements pratiques cumulés devraient être parallèles aux variations des rendements théoriques cumulés et non plus inverses. Nous verrons

plus loin les conclusions fournies par l'étude de deux bilans parallèles d'extraction mettant en jeu deux dilutions extrêmes.

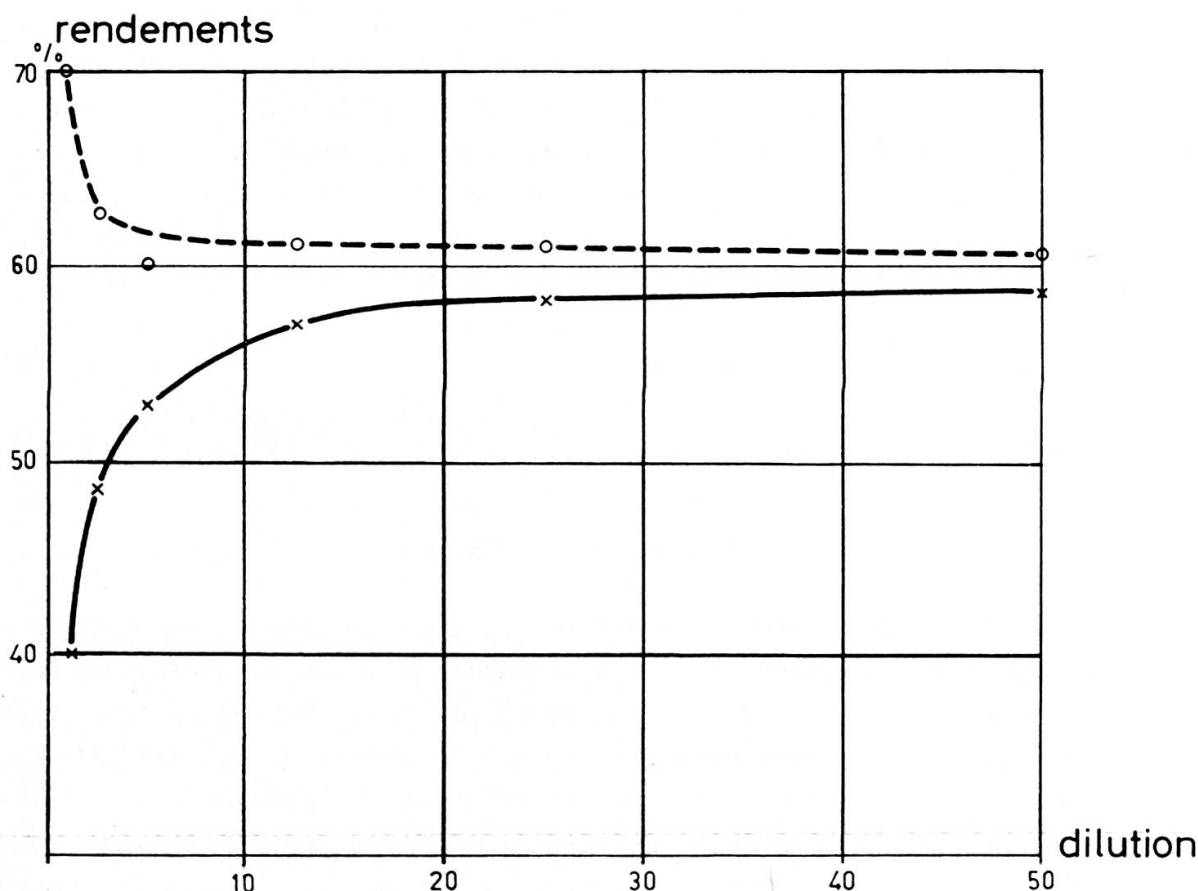


FIG. 1. — Variation des rendements théorique et pratique d'extraction en fonction de la dilution.
 o - - - - o Rendement théorique = N dans 20 ml de solvant en % N prise d'essai.
 x ——— x Rendement pratique = N dans x ml recueilli en % N prise d'essai.

3. Extraction totale par action successive de trois solvants : bilan d'une extraction totale

Des extractions par épuisement à l'aide des 3 solvants — eau, solutions salines, solutions alcalines diluées — utilisés successivement, furent réalisées en observant une dilution moyenne, puis deux dilutions extrêmes.

A) Cas d'une dilution moyenne

Les résultats obtenus, représentés figures 2 et 3, montrent que, dans tous les cas, la majorité du matériel soluble dans un solvant donné est obtenue au cours du premier contact avec ce solvant. D'autre part, si l'extraction saline ne solubilise, dans les conditions où nous avons opéré, qu'une proportion relativement très faible des protéines totales, les solutions alcalines, par contre, permettent de solubiliser une fraction non négligeable des réserves cotylédonaires.

Ces dernières observations sont chiffrées dans le tableau 2 qui permet, par ailleurs, de constater que la technique employée a permis d'extraire 98,3% de l'azote total

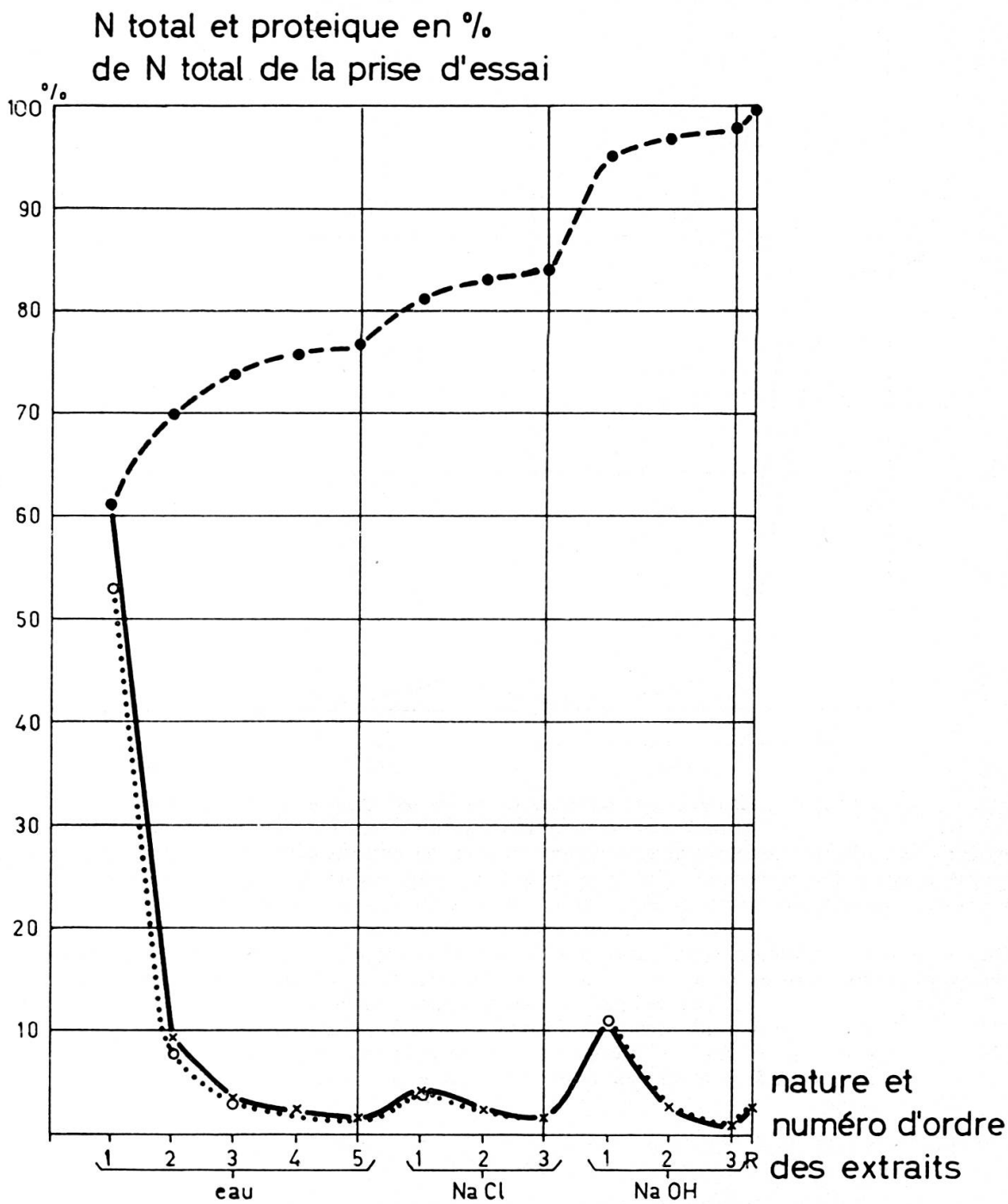


FIG. 2. — Variation des teneurs des extraits en N total et N protéique en fonction de la nature et du numéro d'ordre de l'extrait.
 x ——— x N total extrait à chaque opération en % de N total de la farine.
 o o N protéique (= N après dialyse) extrait à chaque opération en % de N total de la farine.
 ● - - - - ● Valeurs cumulées de l'azote total extrait à chaque opération en % de N total de la farine.

contenu dans la farine. Ajoutons, d'autre part, que 77% environ de l'azote extrait l'est par l'eau.

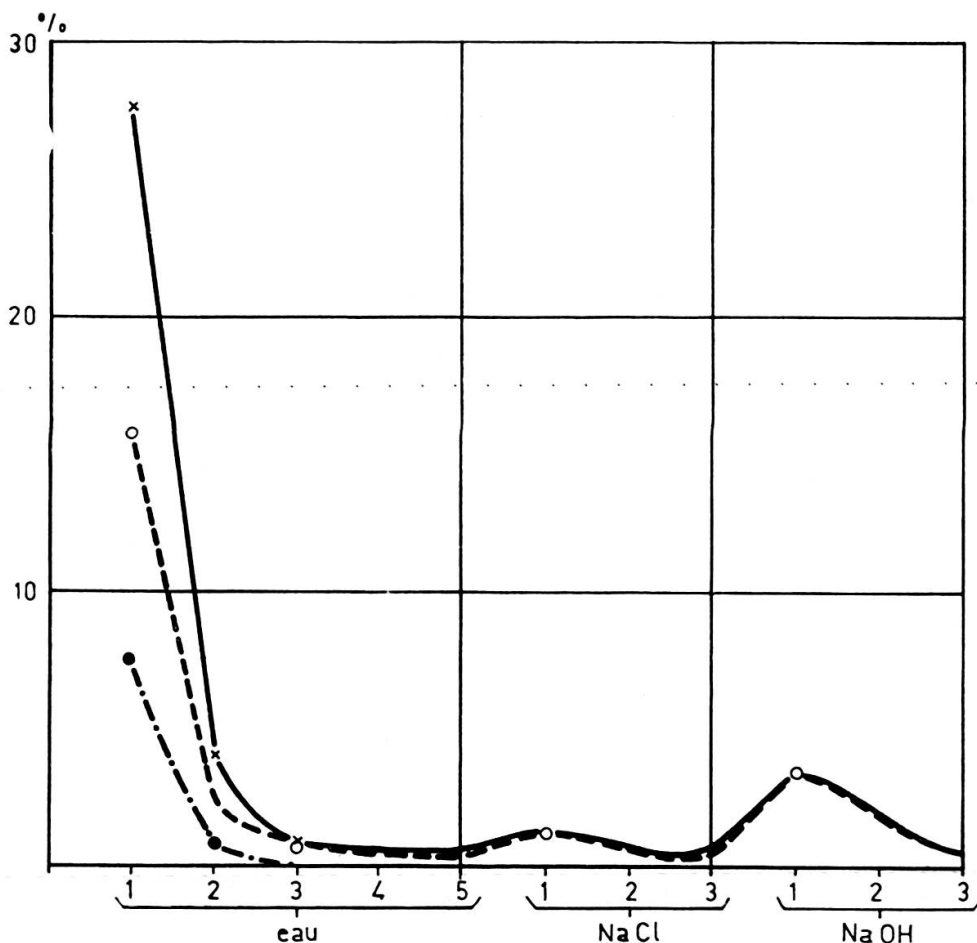


FIG. 3. — Proportions relatives du poids sec, du poids de protéines et du poids de sucre dans les différents extraits.

Les poids secs n'étant pas mesurables directement pour les extraits salins et sodiques ils ne sont pas représentés sur la figure par des points expérimentaux, mais évalués par déduction: en effet, à partir du 3^e extrait aqueux l'écart poids sec — poids de protéine devient très faible et on peut considérer qu'il s'annule pour les extraits suivants.

Parmi les poids de protéine, ceux qui ne sont pas évalués directement en raison de leur très faible valeur sont estimés en multipliant la valeur de N total par 6,3. Ces valeurs approchées ne sont pas représentées par des points figurés sur la courbe.

- x ——— x poids sec en % du poids sec de la prise d'essai.
- o - - - - o poids de protéines en % du poids sec de la prise d'essai.
- — . - . ● poids de sucres en % du poids sec de la prise d'essai.

TABLEAU 2

Bilan d'extraction par les différents solvants.

N total prise d'essai	N total extrait	N total extrait par l'eau	N total extrait par NaCl	N total extrait par NaOH
100	98,3	77,3	7,5	13,5

Le poids de protéines ne représente qu'environ 60% du poids sec extrait (tableau 3), alors que les sucres dialysables atteignent 26,3%. Il convient de noter d'ailleurs que, dès le troisième extrait, il ne subsiste pratiquement plus dans le surnageant que des composés protéiques à poids moléculaire élevé.

TABLEAU 3

Constitution de l'extrait aqueux (calculée sur la somme des trois premiers extraits).

Poids sec extrait	Poids de protéines (= poids sec après dialyse)	Sucres dialysables	Résidu dialysable (sels minéraux, amino acides, etc. par différence)
100	59,7	26,3	14,0

B) Cas de deux valeurs extrêmes de la dilution

Deux prises d'essai, l'une de 8 g, l'autre de 0,2 g de farine ont été mises en suspension dans 10 ml de solvant, ce qui correspond à des dilutions de 1,25 et 50. Ces prises ont été traitées par plusieurs solvants en extractions répétées, comme dans l'expérience précédente. Cet essai ayant pour but de suivre l'extraction des protéines à chaque étape et pour chaque dilution, la teneur en azote total des extraits a seule été évaluée. Le tableau 4 et la figure 4 résument les résultats obtenus.

Remarquons, tout d'abord, que les proportions d'azote total extrait par les deux premiers solvants utilisés varient avec la dilution mais que l'extraction totale par ces solvants est constante et s'élève à 85% environ.

Le tableau 5 met ce fait en évidence. Il permet de constater, en outre, que les valeurs relatives à une dilution moyenne sont intermédiaires entre celles caractéristiques des dilutions extrêmes.

Le fait que le total des quantités d'azote extraites par l'eau et le chlorure de sodium représente, quelle que soit la dilution, une valeur constante de la quantité d'azote initiale, indique que, selon la dilution, une quantité plus ou moins importante de globulines passe dans les extraits aqueux. Une telle situation est normale puisqu'elle dépend de la force ionique existant dans les solutions aqueuses initiales en raison de la teneur en éléments minéraux de la farine. Cette constatation conduit à penser qu'il existe un certain nombre de fractions globuliniques diversement exigeantes à l'égard de la force ionique.

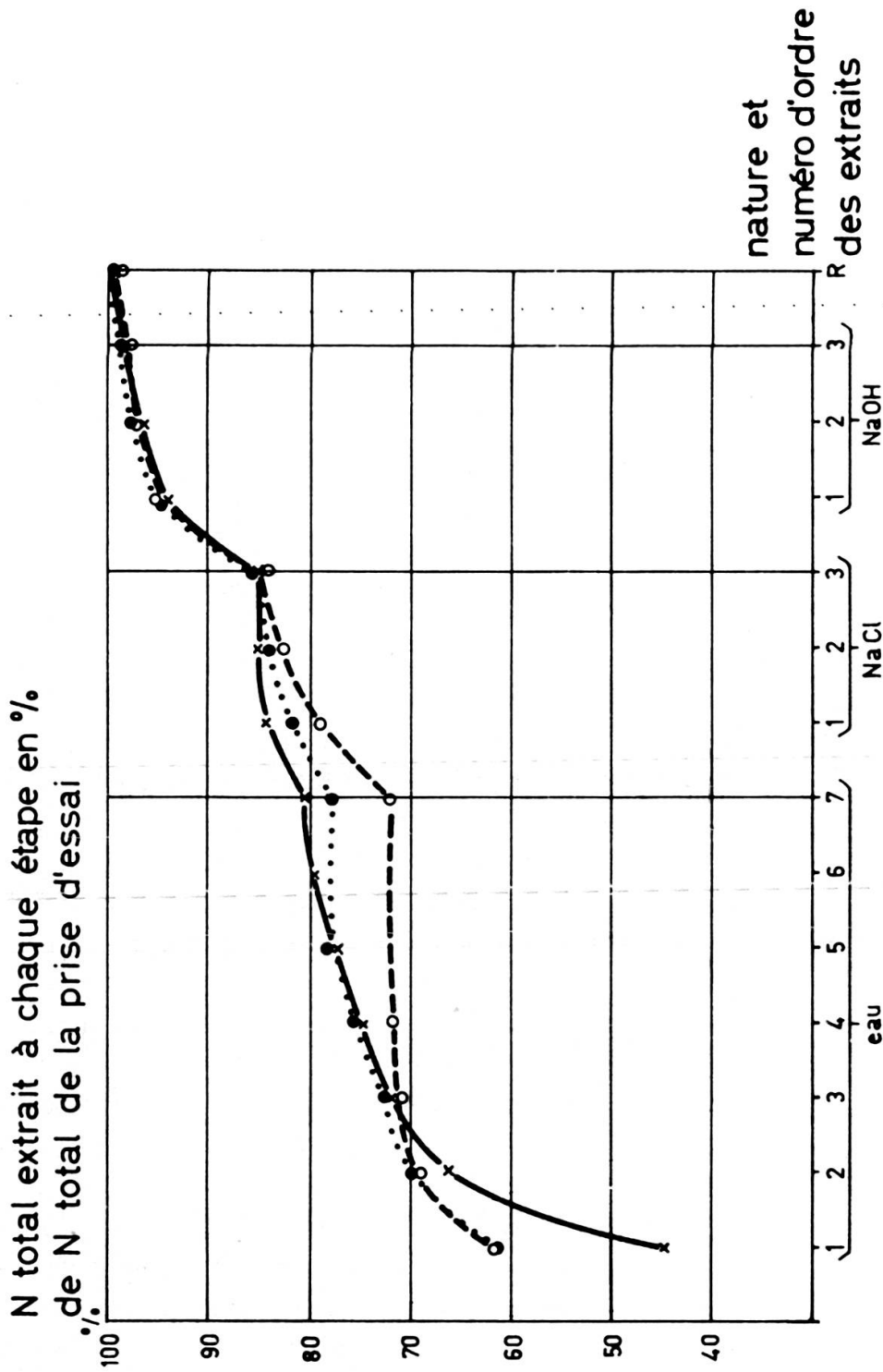


FIG. 4. — Comparaison des valeurs cumulées d'azote total extrait au cours d'extractions complètes mettant en jeu des dilutions différentes.
 x — N total des extraits obtenus à faible dilution $d = 1,25$.
 o — N total des extraits obtenus à forte dilution $d = 50,0$.
 ● — N total des extraits obtenus à dilution moyenne $d = 12,5$.
 (Les points relatifs aux dilutions extrêmes sont tirés du tableau 4, ceux concernant la dilution moyenne du tableau 2).

TABLEAU 4

Rendements d'extractions successives mettant en jeu 2 valeurs extrêmes de la dilution. Les teneurs en azote des extraits sont données en mg et la valeur globale obtenue pour chaque type d'extraction est exprimée en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai (sur la base du total trouvé)

Prise d'essai en mg	8000,0	200,0
Dilution	1,25	50,0
Extraits:		
Eau n° 1	146,7	5,1
2	66,7	0,6
3	20,7	0,2
4	10,5	0,1
5	8,0	—
6	6,9	—
7	4,2	—
	<u>263,7 = 81,0%</u>	<u>6,0 = 72,3%</u>
NaCl 4% n° 1	9,4	0,6
2	4,3	0,4
3	2,3	0,1
	<u>16,0 = 4,9%</u>	<u>1,1 = 13,2%</u>
NaOH 0,1 N n° 1	26,3	0,8
2	9,2	0,2
3	3,9	0,1
4	1,1	—
	<u>40,5 = 12,5%</u>	<u>1,1 = 13,2%</u>
N résiduel dosé	5,2 = 1,6%	0,1 = 1,3%
Total trouvé	325,4 = 100%	8,3 = 100%
Total trouvé en % du total déduit du dosage de l'aliquote	= 99,2%	= 101,2%

TABLEAU 5

Variation des taux d'extraction obtenus par l'eau et les solutions salines en fonction de la dilution. Les valeurs du tableau représentent l'azote total extrait exprimé en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai (sur la base de la valeur totale mesurée)

Dilution	eau	chlorure de sodium	eau + chlorure de sodium
1,25	81,0	4,9	85,9
*12,5	77,3	7,5	84,8
50,0	72,3	13,2	85,5

* Pour cette dilution, les valeurs sont tirées du tableau 2.

4. Influence de la force ionique

Les essais suivants se proposent de confirmer et de préciser les liens existant entre la force ionique des solvants et leur pouvoir solubilisant.

Des prises d'essai de 1 gramme de farine, fraîchement moulue et homogénéisée provenant du même lot de cotylédons, furent mises en solution simultanément dans des conditions identiques (15 ml de solvant, 10 minutes d'agitation, 30 minutes de centrifugation à 30 000 g à 2° C). Les teneurs en azote total des extraits recueillis furent déterminées. Les résultats sont groupés dans le tableau 6.

TABLEAU 6

Teneur en azote total des 3 premiers extraits recueillis au cours de 6 extractions simultanées mettant en jeu des forces ioniques croissantes. L'azote total de chaque extrait est exprimé en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

n° d'ordre des extraits	solvant utilisé					
	eau bidistillée	NaCl 0,5% ($\Gamma_2 = 0,085$)	NaCl 1% (0,17)	NaCl 2% (0,34)	NaCl 4% (0,68)	NaCl 6% (1,02)
1	55,0	42,5	57,0	70,0	74,0	73,1
2	15,8	6,0	8,2	9,0	10,0	10,0
3	8,0	2,0	2,8	2,9	2,9	3,0
Totaux	78,8	50,5	68,0	81,9	86,9	86,1

Il n'est pas surprenant de constater que les solutions salines extraient d'autant plus de protéines que leur force ionique est plus élevée, le minimum de solubilité

étant constaté pour la force ionique la plus faible (0,085). Mais que les extraits aqueux soient plus riches que les extraits salins de force ionique 0,085, voilà qui se conçoit plus difficilement. On peut admettre que le premier extrait aqueux ait une force ionique supérieure à celle des solutions de chlorure de sodium à 0,5% bien qu'encore il soit difficile de concevoir que les électrolytes solubilisés par l'eau ne le soient pas par les solutions salines. Si cela était, on s'attendrait cependant à ce que ce phénomène s'atténue pour les extraits suivants, les électrolytes se raréfiant dans la farine au fur et à mesure que l'extraction avance, or la différence subsiste encore au niveau du troisième extrait.

Mais, s'il semble difficile de concevoir un refus des électrolytes de passer en solution dans d'autres solvants que l'eau distillée, on peut admettre plus facilement que les corps satellites, dissouts préalablement aux protéines et favorisant leur solubilisation, ne sont pas des ions mais des molécules organiques possédant la propriété de se dissoudre beaucoup mieux dans l'eau pure que dans les solutions salines de force ionique si basse soit-elle. On peut admettre aussi que les protéines concernées forment dans la graine, avec ces molécules annexes, un complexe soluble seulement dans l'eau pure; par ailleurs, l'augmentation de la force ionique des solvants favorisant la dissolution des globulines, seules les solutions salines de faible force ionique seraient défavorisées. Nous reviendrons sur ce problème dans un prochain chapitre.

Un dernier point reste à préciser: la concentration en chlorure de sodium nécessaire et suffisante pour conférer aux solutions salines un pouvoir dissolvant maximum est-elle bien la concentration de 4% que révèle l'examen du tableau 6? Un essai complémentaire, permettant de comparer les taux d'extraction obtenus par des solutions allant jusqu'à une concentration en NaCl de 10%, montre qu'il en est bien ainsi.

5. *Influence du pH des solvants*

Des extraits effectués par l'eau suivant le technique habituelle (dilution 15), à un même pH et une même force ionique à l'aide de tampons différents, ont été comparés. Un système tampon réalisable dans la zone de pH 7, autre que le tampon phosphate, est le tampon barbital. Malheureusement, le diéthylbarbital contient de l'azote. Nous l'avons cependant utilisé en prenant soin de réaliser, quant au véronal, un blanc rigoureusement identique. Les résultats figurent dans le tableau 7.

Nous constatons une légère amélioration du taux d'azote extrait par les solutions de pH 7 et c'est bien la seule stabilisation du pH du solvant aux alentours de 7 qui est responsable de l'augmentation constatée, pour une force ionique donnée, du pouvoir dissolvant des solutions salines. Cette augmentation est particulièrement sensible aux faibles forces ioniques.

TABLEAU 7

Comparaison de l'influence de 2 tampons différents de même pH. La teneur en azote total des extraits est exprimée en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

solvants	force ionique		0,18		0,68
	pH du solvant		farine fraîche	de 3 j.	fraîche
NaCl	6,05		61	52	72
tampon phosphate	7,00		69	68	77
tampon phosphate + NaCl	7,00		69	68	—
tampon véronal	7,00		69	68	77

6. Influence de l'ordre d'entrée en action des deux solvants eau-solutions salines

Le tableau 8, qui groupe les résultats obtenus lors d'extractions totales simultanées dont les conditions ne différaient que par l'ordre d'action des 2 premiers solvants, révèle une augmentation sensible du rendement d'extraction dans le cas où agissent en premier les solutions salines. De cette manière, une seule extraction suffirait pour une étude qualitative (73% des protéines figurant dans cet extrait sur 87 solubilisables) et, lors d'une extraction exhaustive, le nombre d'extraits successifs nécessaires se trouverait également sensiblement réduit.

7. Influence de la durée de conservation de la farine

Des défauts de reproductibilité concernant le taux d'azote extrait par l'eau agissant en premier conduisirent à soupçonner le rôle que peut jouer la durée de conservation de la farine sur la solubilisation des protéines qu'elle contient. Pour préciser cette influence, une farine, fraîchement moulue et homogénéisée, fut en partie soumise immédiatement à l'extraction; le reste fut testé 8 jours plus tard après avoir été conservé en congélateur à -10°C .

Les résultats (tableau 9) révèlent tout d'abord l'accentuation, sur une farine de 8 jours, du contraste qui avait été constaté sur les rendements d'extraction lorsqu'intervient une inversion de l'ordre d'action des 2 premiers solvants: eau, solution saline. Ici, le premier extrait salin solubilise autant d'azote que tous les extraits aqueux réunis.

TABLEAU 8

*Comparaison des rendements de 2 extractions totales effectuées en intervertissant l'ordre d'action des 2 premiers solvants : eau, solution saline.
L'azote total de chaque extrait est exprimé en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.*

	Eau-NaCl 4 %-NaOH 0,1N	NaCl 4 %-Eau-NaOH 0,1N
<i>1^{er} solvant</i>		
extrait n° 1	55,0	73,1
2	15,8	10,5
3	5,3	2,8
4	2,5	0,6
5	0,9	0,1
	79,5	87,1
<i>2^e solvant</i>		
extrait n° 1	5,2	0,4
2	1,4	0,1
3	0,5	0,0
	7,1	0,5
<i>3^e solvant</i>		
extrait n° 1	10,3	10,1
2	1,0	1,2
3	0,1	0,0
	11,4	11,3
N total extrait	98,0	98,9
N résiduel dosé	1,5	1,4
total trouvé	99,5	100,3

Conjointement est mise en relief l'influence considérable jouée par l'âge de la farine. Nous constatons une diminution générale de la solubilité affectant, tout particulièrement, les protéines extraites par l'eau.

A. *Influence de la conservation sur les premiers extraits aqueux.*

Pour préciser la portée de cette observation, quatre prises d'essai de 1 gramme chacune, la première de farine fraîchement moulue, les autres de farines conservées après mouture à -10° : 1 jour, 15 jours et 40 jours, ont été mises en extraction dans les conditions habituelles ($d = 15$). Les teneurs en azote des 2 premiers extraits aqueux ont été déterminées. Le tableau 10 groupe les résultats obtenus auxquels ont été ajoutés les chiffres issus du tableau 9.

TABLEAU 9

Comparaison des rendements d'extraction totale faisant intervenir, d'une part, une inversion dans l'ordre de succession des solvants, d'autre part, des farines d'âges différents. Les teneurs en azote sont exprimées en pourcentages de l'azote total de la prise d'essai.

Les chiffres concernant les extractions sur farine fraîche (0 jour) sont repris du tableau 8.

	Eau-NaCl 4%-NaOH 0,1N		NaCl 4%-Eau-NaOH 0,1N	
	0 jour	8 jours	0 jour	8 jours
<i>1^{er} solvant</i>				
extrait n° 1	55,0	34,0	73,1	67,5
2	15,8	18,8	10,5	9,1
3	5,3	8,0	2,8	2,7
4	2,5	2,6	0,6	0,8
5	0,9	1,0	0,1	0,3
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	79,5	64,4	87,1	80,4
<i>2^e solvant</i>				
extrait n° 1	5,2	12,3	0,4	0,4
2	1,4	3,3	0,1	0,4
3	0,5	0,7	0,0	0,3
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	7,1	16,3	0,5	1,1
<i>3^e solvant</i>				
extrait n° 1	10,3	13,1	10,1	13,5
2	1,0	3,0	1,2	2,5
3	0,1	1,1	0,0	1,0
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	11,4	17,2	11,3	17,0
total extrait	98,0	97,9	98,9	98,5
N résiduel dosé	1,5	1,5	1,4	1,6
total trouvé	99,5	99,4	100,3	100,1

L'augmentation de la durée de conservation de la farine diminue la solubilité des protéines et les altérations responsables de cette perte progressive de solubilité se produisent dès le premier jour et atteignent leur plein effet au bout de 15 jours.

On peut entrevoir 2 causes possibles de ce phénomène. Ou bien certaines catégories de protéines, sinon toutes, sont modifiées pendant le vieillissement de la farine et présentent alors d'autres exigences pour passer en solution, ou bien, à la suite d'altérations, les électrolytes ou les molécules solubilisantes que contient la farine ont été progressivement mobilisées dans des combinaisons insolubles et ne passent

TABLEAU 10

*Influence de l'âge de la farine sur la solubilisation des protéines par l'eau distillée.
Les teneurs en azote total de chaque extrait sont exprimées en pourcentages de l'azote total de la prise
d'essai.*

	durée de conservation de la farine après mouture				
	0 jour	1 jour	8 jours	15 jours	40 jours
extrait n° 1	55,0	42,1	34,0	22,0	22,0
extrait n° 2	16,3	17,0	18,8	2,8	2,5
total	71,3	59,1	52,8	24,8	24,5

plus dans les extraits aqueux; cette seconde hypothèse implique que les extraits salins se montrent insensibles au vieillissement, l'examen du tableau 9 révèle une baisse du taux d'extraction, moins importante que celle présentée par les extraits aqueux, mais réelle. L'essai suivant précise la portée de cette perte.

B. *Influence du vieillissement sur les extraits salins*

Cet essai reproduit une extraction totale réalisée exactement dans les mêmes conditions que celle rapportée dans le tableau 9, qui faisait intervenir les solutions salines en premier solvant sur une farine de 8 jours, mais ici, il s'adresse à une farine conservée 18 jours afin de permettre aux altérations consécutives au vieillissement d'atteindre leur plein effet. En outre, une extraction parallèle, mettant en jeu une force ionique double et portant sur les 2 premiers extraits, était effectuée afin de vérifier si une augmentation de la force ionique ne pouvait compenser les effets du vieillissement. Le tableau 11 rend compte des résultats obtenus.

Nous constatons, tout d'abord, que l'augmentation de la force ionique au-delà de 0,68 (NaCl 4%) ne compense pas les effets de la conservation. En outre, la diminution de rendement d'extraction des solutions salines s'est légèrement accentuée par rapport à celle constatée avec une farine de 8 jours, elle n'atteint cependant pas les proportions de la baisse de rendement subie par les extraits aqueux dans les mêmes conditions.

De plus, un fait nouveau se confirme, déjà décelable dans le tableau 9: la quantité globale de protéines extraites par l'eau et les solutions salines varie avec la durée de conservation de la farine cependant que le taux d'azote total extrait reste inchangé et demeure égal à environ 98,5% de l'azote total de la farine. C'est l'extrait sodique qui rétablit l'équilibre. Ce fait semble curieux puisque les solutions alcalines diluées sont censées solubiliser une catégorie spéciale de protéines: les glutélines.

TABLEAU 11

Action du plein effet du vieillissement sur la marche d'une extraction totale réalisée avec intervention prioritaire des solutions salines.

La teneur en azote total de chaque extrait est exprimée en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

	1 ^{er} solvant NaCl 4%		1 ^{er} solvant NaCl 8%	
	0 jour	18 jours	0 jour	18 jours
<i>1^{er} solvant</i>				
extrait n° 1	73,9	66,9	72,9	66,0
2	10,1	9,7	10,4	10,0
3	2,6	2,5		
4	0,5	0,4		
5	0,1	0,3		
NaCl 8%	0,1	0,3		
	<hr/> 87,3	<hr/> 80,1		
<i>2^e solvant (eau)</i>				
extrait n° 1	0,3	0,3		
2	0,0	0,1		
	<hr/> 0,3	<hr/> 0,4		
<i>3^e solvant (NaOH 0,1 N)</i>				
extrait n° 1	9,6	15,3		
2	1,6	2,1		
3	0,2	0,3		
	<hr/> 11,4	<hr/> 17,7		
total extrait	99,0	98,2		
N résiduel dosé	1,3	1,4		
total trouvé	100,3	99,6		

Voici brièvement résumées les constatations auxquelles a conduit l'étude du facteur « conservation de la farine »: la solubilité des protéines solubles dans l'eau et les solutions salines contenues dans les cotylédons est affectée par le vieillissement de la farine. Les plus touchées sont les protéines extractibles par l'eau, les protéines manquantes, dans ce cas, sont récupérées dans l'extrait salin. Les protéines solubles à force ionique plus élevée sont également touchées et, dans ce cas, l'augmentation de la force ionique ne permet pas d'extraire les protéines manquantes. C'est alors l'extraction alcaline diluée qui, provoquant sans doute une rupture de liaisons dans

la molécule ou la dissociation d'un complexe insoluble, permet de solubiliser ce qui a été affecté.

A la lumière de ces données nouvelles, nous pouvons compléter les observations du chapitre précédent concernant l'influence de la force ionique sur la solubilisation.

Les valeurs extraites des tableaux 6, 9, 10, auxquelles s'ajoutent les résultats d'un essai supplémentaire, sont réunies dans le tableau 12 et permettent de parfaire les conclusions du paragraphe précédent.

TABLEAU 12

Mise en évidence du rôle joué par la durée de conservation de la farine sur la solubilisation des protéines dans des solutions de force ionique croissante (seules ont été étudiées les valeurs critiques de la force ionique : 0,085 et 0,68, correspondant l'une au minimum de solubilité, l'autre au seuil de l'optimum). Dans le tableau figurent les teneurs en azote du premier extrait exprimées en pourcentage de l'azote total de la farine.

durée de conservation de la farine	solvants utilisés		
	Eau	NaCl 0,5 % ($I_x = 0,085$)	NaCl 4 % ($I_x = 0,68$)
0 jour	55,0	42,5	74,0
1 jour	42,1	—	—
8 jours.	34,0	29,0	67,5
15 jours	22,0	27,0	66,9

Nous constatons que, les extraits aqueux étant les plus touchés par les effets de la conservation, l'écart existant entre les teneurs en azote de l'extrait aqueux et de l'extrait salin de force ionique 0,085 s'atténue après 8 jours de conservation et s'inverse après 15 jours. Les hypothèses émises pour expliquer le faible pouvoir solubilisant des solutions de force ionique très basse se trouvent renforcées. Les solutions salines ont un pouvoir solubilisant croissant avec leur force ionique jusqu'à un seuil optimum. Ce pouvoir se trouve diminué dans les mêmes proportions, quelle que soit la force ionique, par la conservation de la farine. L'eau distillée jouit d'un pouvoir solubilisant supérieur à celui des solutions salines de faible force ionique, mais ce pouvoir ne résiste pas aux effets néfastes de la conservation de la farine.

Dans le cas des solutions salines, la légère diminution de solubilité peut être attribuée à une altération générale des protéines de la farine. Dans le cas des solutions aqueuses, la baisse considérable de solubilité pourrait s'expliquer par la perte progressive de l'aptitude de certains ions de la farine à passer en solution; mais nous avons vu que cette hypothèse ne tient pas devant le fait que, lors d'extractions par

épuisement effectuées parallèlement avec l'eau et le chlorure de sodium à 0,5%, la supériorité de l'eau comme solvant se manifeste encore au niveau du troisième extrait dans lequel on ne peut raisonnablement plus soupçonner l'existence d'électrolytes provenant de la farine.

Il est plus vraisemblable de penser que les matières solubilisantes sont des molécules organiques formant dans la graine, avec certaines protéines, un complexe hydrosoluble permettant la solubilisation dans l'eau de protéines qui normalement exigeraient des solutions de force ionique supérieure à 0,085, mais arrangement moléculaire fragile et progressivement dissocié lorsque les structures de la graine sont bouleversées par la mouture.

D'autre part, nous avons été amenée à soupçonner l'importance de l'âge de la graine sur la sensibilité des protéines au facteur conservation de la farine.

8. *Influence de l'âge de la graine et révélation d'un rythme endogène*

Des essais effectués en 1964 et en 1965 sur des graines récoltées en janvier 1964, révélèrent une influence très nette du vieillissement de la farine sur la solubilité lorsque les essais furent effectués en février, mars, avril 1964. En juin, cet effet était déjà très atténué. En 1965, les mêmes constatations laissèrent supposer qu'il existe dans la graine quiescente un cycle au cours duquel il est permis de penser que certaines globulines s'associent à une substance compagne pour former un complexe hydro-soluble¹. Ce complexe se dissocierait à certaines époques pour se reconstituer à d'autres. Toutefois, les constatations sur ce point ayant été faites fortuitement lors d'études d'autres facteurs, les données expérimentales recueillies en 1964 et 1965 ne sont pas assez continues pour préciser les modalités du cycle, mais en révèlent néanmoins l'existence.

Nous avons alors entrepris en 1966 une série d'essais régulièrement échelonnés en étudiant systématiquement la solubilité dans l'eau des protéines de graines stockées provenant de la récolte 1964. Chaque mois un essai a été fait sur un lot de farine fraîchement moulue. Cette même farine était alors conservée 15 jours après lesquels une seconde extraction avait lieu. Nous espérions constater, sur le second essai, une perte de solubilité très marquée en février, mars, avril, comme nous l'avions noté en 1964 et 1965. A notre surprise, les variations furent très faibles et les différences enregistrées ne furent plus significatives contrairement à ce qui avait été constaté les deux années précédentes (fig. 5).

Alors que nous nous attendions à la reproductibilité, la troisième année, du rythme périodique observé les années précédentes, nous constatons l'évanouissement de ce cycle. Mais alors apparaît une autre tendance, en continuité avec l'évolution des années précédentes: c'est la diminution du maximum de solubilité. Ainsi l'éva-

¹ Les rapports entre substances phosphorées organiques et protéines seront étudiés dans le chapitre 3.

nouissement du cycle n'indiquerait peut-être pas la rupture d'un rythme constaté mais son aboutissement; l'écart entre maximum et minimum de solubilité s'atté-

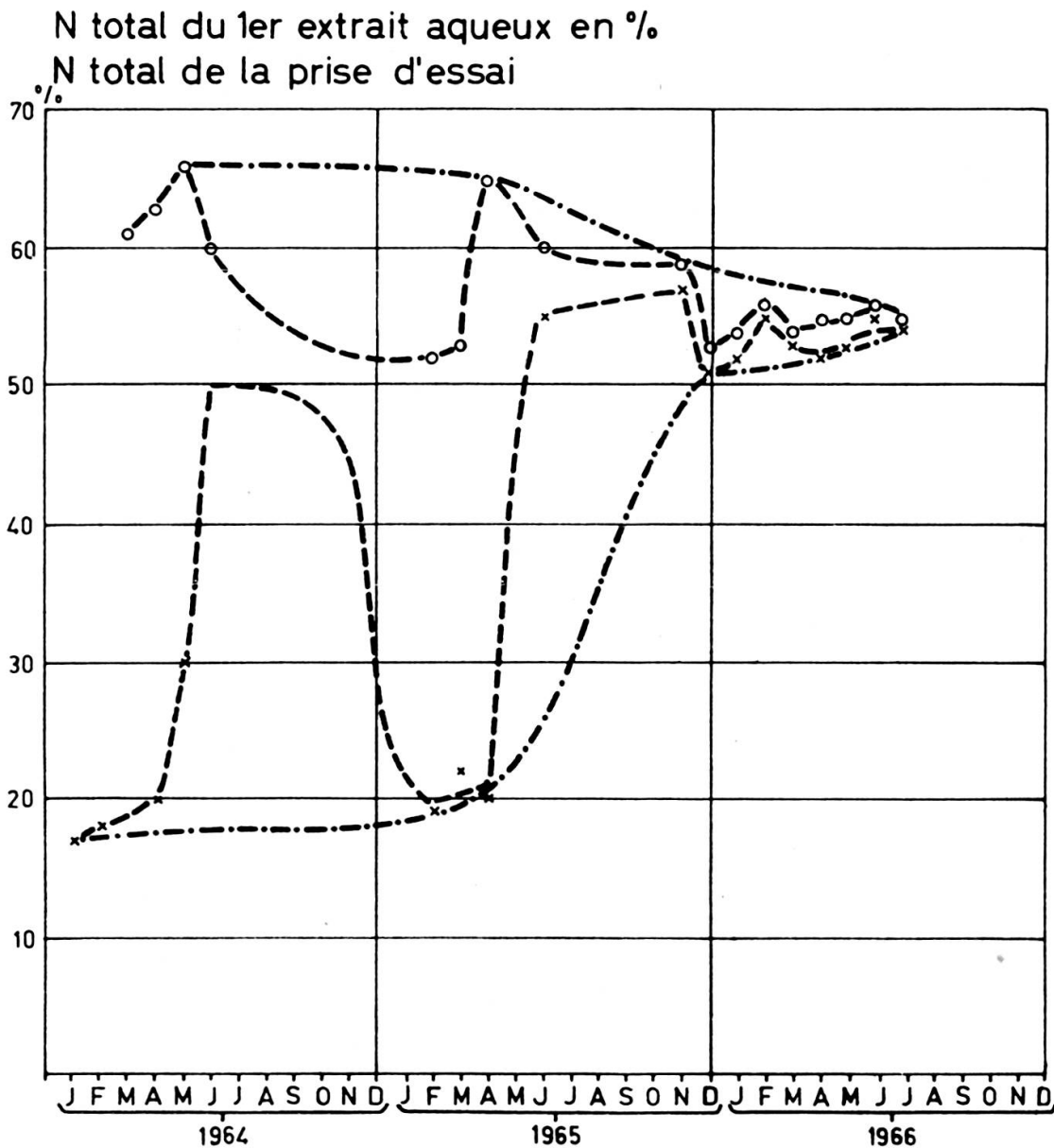


FIG. 5. — Fluctuations de l'hydrosolubilité des protéines mettant en évidence une rythmicité annuelle conjuguée à un effet de sénescence.

- o o o Points expérimentaux figurant la solubilité maximum dans l'eau des protéines de farine fraîchement moulue.
- x x x Points expérimentaux figurant la solubilité correspondante des protéines de la même farine après conservation de 15 jours.
- - - - - Rythmicité périodique.
- . - . - Effet de sénescence.

nuerait jusqu'à disparaître. Il y aurait 3 manifestations conjuguées d'un rythme endogène: premièrement rythme annuel conditionnant la solubilité des globulines avec apparition en février, mars, avril d'un maximum dans l'écart des taux de pro-

téines solubilisées, d'une part en conditions favorables, d'autre part en conditions défavorables; deuxièmement, évolution continue dans le temps vers une diminution progressive allant jusqu'à l'annulation de cet écart; troisièmement, abaissement lent des maximum de solubilité.

Nous ne voulons cependant pas tirer de conclusions définitives des constatations que nous suggère la figure 5 sur laquelle nous n'avons pu figurer des points expérimentaux réguliers qu'à partir de la fin de l'année 1965. Ce n'est, en effet, qu'à cette époque que nous avons pu déceler l'existence d'un cycle et entreprendre alors d'en rechercher systématiquement les manifestations (Signalons la seule différence qui distingue les essais de ces 3 années: en 1964 et 1965 les essais furent effectués à Dakar, en 1966 à Genève).

CHAPITRE 3

ANALYSE ET FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS; ISOLEMENT ET DÉFINITION DES FAMILLES PROTÉIQUES.

Nous allons maintenant situer, avec plus de précision, la place des protéines au sein de tous les corps azotés extraits par l'eau et les solutions salines après avoir établi, en première partie, un schéma de fractionnement des extraits conduisant à l'isolement de 3 familles protéiques déterminées par leurs caractères de solubilité. Ensuite la sensibilité propre de chacune de ces familles aux influences révélées dans le second chapitre sera recherchée.

Pour terminer, l'importance des substances phosphorées et glucidiques dans les extraits sera établie ainsi que leur rôle sur la solubilité des protéines.

I. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT PROTÉIQUE

Les essais précédents ont montré que les 2 premiers extraits salins réunis renfermaient la presque totalité des protéines sels-solubles que nous étudions ici. C'est à la réunion de ces 2 extraits que nous appliquons le terme général extrait protéique.

Nous allons définir les meilleures conditions qui permettent d'individualiser les 3 familles, albumines, pseudoglobulines et globulines, auxquelles appartiennent la majorité des protéines de dolique.

Nous nous sommes adressée à une séparation par voie chimique couramment utilisée dans les études sur les protéines sériques et qui fait intervenir des précipitations par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation (schéma 1).

Comme nous l'avons signalé antérieurement, l'utilisation de l'électrodialyse en remplacement des dialyses a permis de réduire considérablement les durées d'isolement, d'autant plus que la précipitation de toutes les protéines par le sulfate d'ammonium à saturation, au cours de la première étape, permet d'éliminer d'emblée toutes les molécules gênantes telles que le sucre et la phytine qui dialyseraient lentement. Le nombre d'heures, figurant près de chaque famille protéique, indique le temps écoulé entre la mise en solution et l'obtention de la solution protéique purifiée.

D'autre part, afin d'identifier les différents constituants azotés de l'extrait protéique, nous avons conduit la série des opérations résumées dans le schéma 2.

Le tableau 13, établi à partir des résultats obtenus, donne la proportion et les caractères de solubilité des diverses catégories de corps azotés solubilisés. Il est intéressant de noter l'existence d'une petite quantité de protéines (2,7%–2,8% de l'azote extrait) particulièrement stables ne précipitant ni par saturation des solutions en

SCHÉMA 1

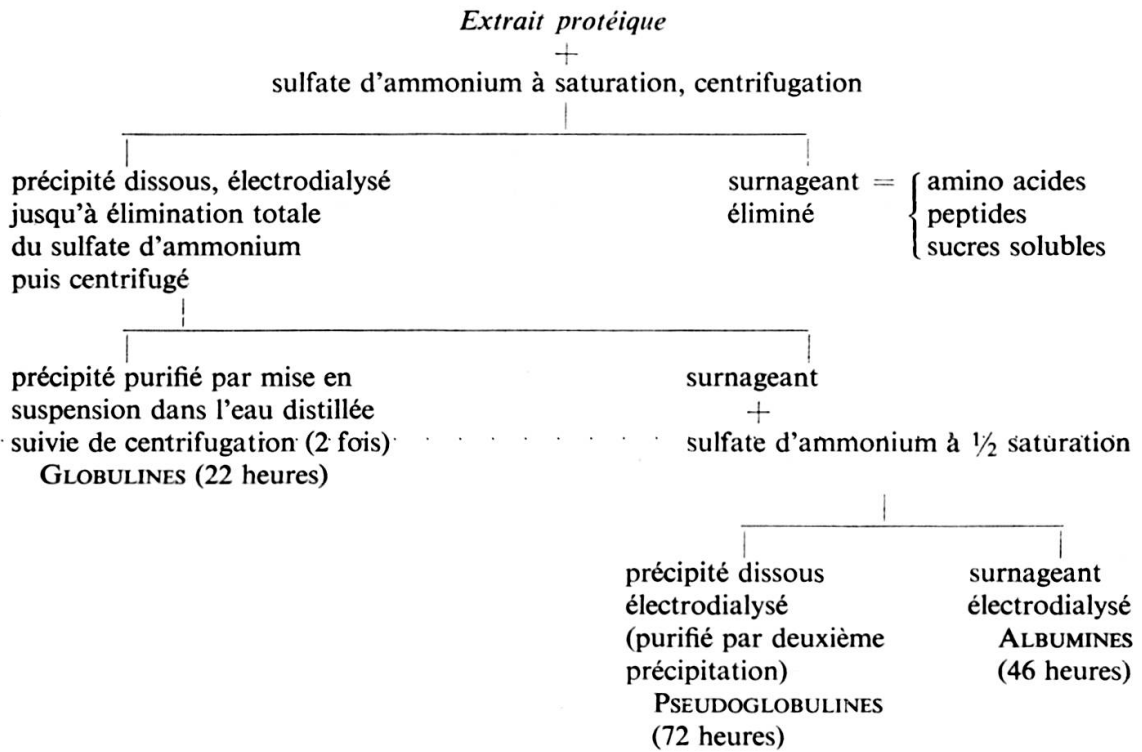
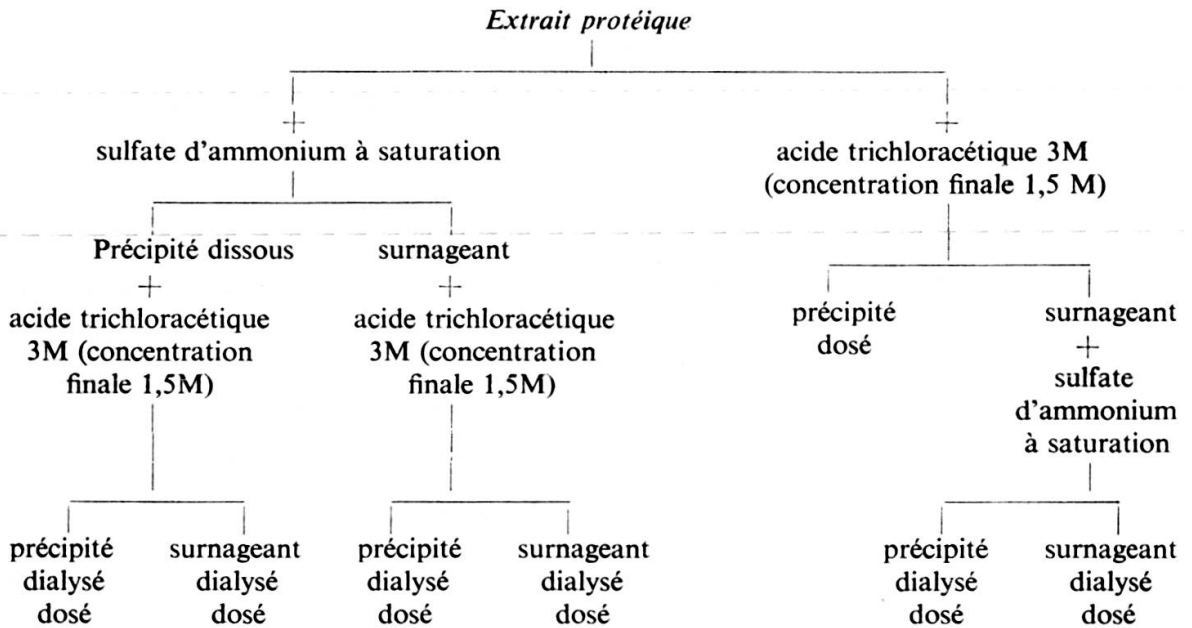


SCHÉMA 2



sulfate d'ammonium seul, ni par l'action de l'acide trichloracétique seule, mais par les 2 actions conjuguées. Par contre, une faible partie des peptides dialysables (3,6% de l'azote extrait) est précipité par cet acide. Quant aux 3 familles protéiques (albumines, pseudoglobulines, globulines), elles représentent près de 78,8% de l'azote total d'extrait et sont constituées en majorité de globulines (81%).

TABLEAU 13

Nature et proportions des différents constituants azotés des cotylédons de graine de dolique extraits par l'eau et les solutions salines.

N total extrait						
100						
N dialysable		N non dialysable				
15,2		84,8				
soluble dans ATC	insoluble dans ATC	soluble dans ATC		insoluble dans ATC		
11,6	3,6	précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation				
		non précipitable	précipitable	non précipitable	précipitable	
		0,5	2,7	2,8	78,8	
					ALBUMINES	PSEUDO-GLOBULINES
					9,9	4,9
						64,0

II. SENSIBILITÉ PROPRE DE CHAQUE FAMILLE AUX DIVERSES INFLUENCES

1) *Nature et proportions des différentes familles protéiques solubilisées aux principales étapes d'une extraction.*

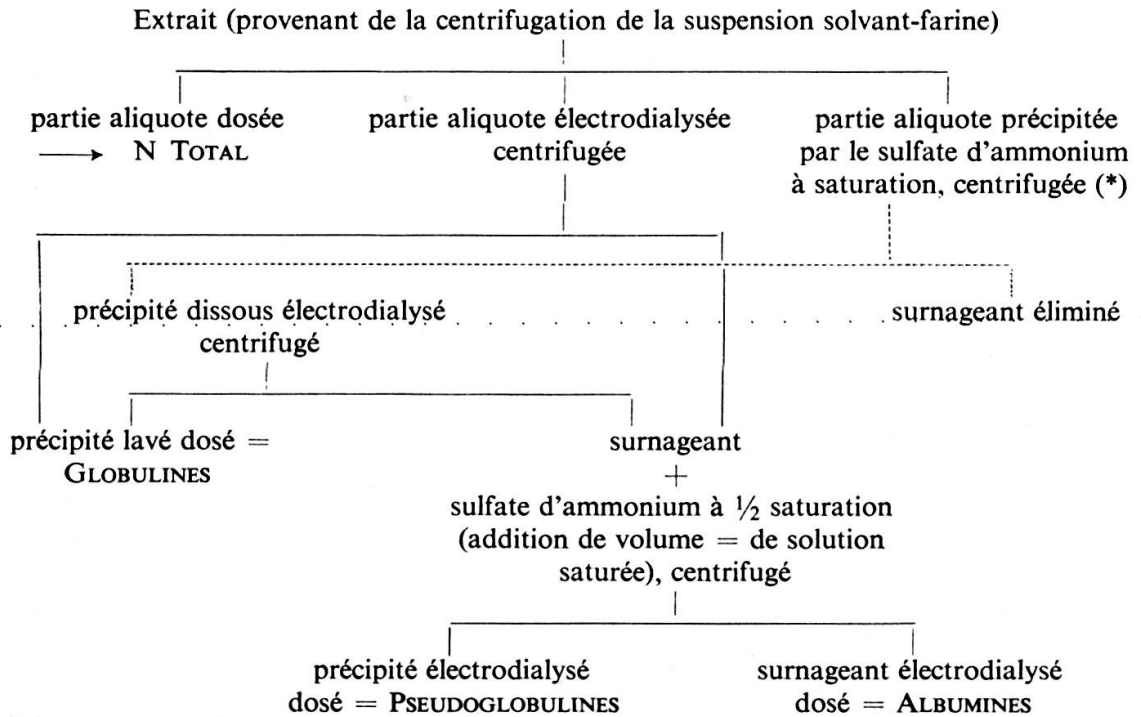
Afin de savoir si l'extraction saline dissout les albumines aussi bien que le fait l'extraction par l'eau, le fractionnement exprimé par le schéma 3 (trait plein) a été appliqué à 3 extraits de farine conservée, l'un utilisant l'eau comme solvant, les deux autres des solutions de chlorure de sodium concentrées respectivement à 0,5 et 4%.

Nous constatons (tableau 14) que les variations du taux d'extraction, provoquées par les changements de force ionique des solvants, sont imputables aux globulines et non aux albumines ou aux pseudoglobulines qui s'extrait aussi facilement en solutions salines qu'en solution aqueuse.

L'aptitude des extraits salins à solubiliser les 3 familles protéiques extractibles est ainsi affirmée. Dans le cas d'une farine conservée 15 jours, les solutions salines de force ionique 0,68 (NaCl 4%) solubilisent autant d'albumines et de pseudoglobulines que l'eau distillée et beaucoup plus de globulines. Un essai ultérieur doit permettre de généraliser la supériorité des extractions salines directes en l'étendant au cas de farines fraîchement moulues.

SCHÉMA 3

Fractionnement d'un extrait conduisant à la détermination des proportions relatives des différentes familles protéiques qu'il contient.



* Le schéma trait plein correspond aux tableaux 14 et 16 et le schéma en partie pointillé au tableau 15.

TABLEAU 14

Répartition de l'azote extrait par des solutions de forces ioniques croissantes au sein des 3 familles protéiques (farine de 15 jours, 1^{er} extrait).

Les teneurs sont exprimées en pourcentage de l'azote total de la farine.

nature du solvant	différentes formes d'N	N total	N après dialyse	
			A + Pg	G
eau		22,5	13,2	1,6
NaCl 0,5%		27,0	13,8	6,0
NaCl 4%		69,0	13,5	48,7

2. Nature et proportions des protéines affectées par la conservation de la farine

Trois extractions parallèles par l'eau ont été effectuées, l'une s'adressant à une farine fraîchement moulue, la seconde à une farine conservée 1 jour, la troisième à

une farine de 30 jours. Le fractionnement du schéma 3 (pointillé) a été appliqué au premier extrait de chaque lot. Les résultats sont rapportés dans le tableau 15.

TABLEAU 15

Répartition de l'azote extrait par l'eau, agissant sur des farines plus ou moins fraîches, au sein des 3 familles protéiques
Les teneurs en azote du premier extrait de chaque série sont exprimées en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

durée de conservation	différentes formes d'N	N total extrait	N après dialyse précédée de précipitation par saturation avec le sulf. d'ammonium	
			A + Pg	G
0 jour		57,4	12,2	31,0
1 jour		43,0	12,0	21,1
15 jours		19,9	10,9	1,8

La encore, ce sont les globulines qui subissent les effets de la durée de conservation de la farine. Ceci n'est pas surprenant. En effet, ce sont les extraits aqueux et non les extraits salins qui manifestent une grande sensibilité à l'action de la conservation. Les globulines ne se dissolvent dans l'eau qu'en présence de molécules solubilisantes. La conservation affecterait la présence de ces molécules. Toutefois, le taux d'albumines décroît légèrement lorsque le temps de conservation se prolonge. La solubilité générale de toutes les protéines, solubilité propre, indépendante des solvants, subit une baisse lente et progressive lorsque la farine est conservée, même à basse température (-10°)¹.

3. Comparaison des 2 modes d'isolement des familles protéiques

L'isolement des familles protéiques a été réalisé par dialyse de l'extrait brut et les résultats obtenus ont été comparés à ceux fournis par dialyse précédée du relargage des protéines par le sulfate d'ammonium. Le tableau 16, relatif à l'isolement des protéines sans relargage préalable, montre une perte générale globale supérieure dans le cas où une dialyse simple de 7 jours a succédé à une électrodialyse de 20 heures. Ce fait indique que l'électrodialyse de 20 heures ne suffit pas pour éliminer tout ce qui est éliminable; de nombreuses molécules dialysables, en effet, ne sont pas électriquement chargées. Mais une dialyse prolongée succédant à l'électrodialyse brève, si elle est efficace, devient dénaturante comme le montre l'augmentation relative du

¹ Il convient de remarquer, en outre, la plus forte proportion de substances azotées, dialysables ou non, précipitables par le sulfate d'ammonium que contient l'extrait de farine fraîche.

TABLEAU 16

Teneur en azote albuminique ou globulinique des extraits aqueux bruts dialysés ou électrodialysés. Les teneurs sont exprimées en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

durée de conservation \ nature et durée de la dialyse	N total	électrodialyse 20 heures		électrodialyse 20 heures suivie dial. simple 7 j.	
		A + Pg	G	A + Pg	G
0 jour	57,4	13,9	34,0	8,8	37,4
1 jour :	43,0	13,6	24,1	8,9	26,3
15 jours	19,9	13,5	1,8	9,0	5,0

taux de globulines; ce sont les plus instables des albumines ou des pseudoglobulines qui ont précipité et sont venues grossir le lot des globulines, nous constatons, en effet, une diminution sensible du taux d'albumines-pseudoglobulines. D'ailleurs, la dénaturation, à ce stade, est évidente: on constate un rosissement du surnageant albuminique et un virage au gris du précipité globulinique¹.

L'élimination des molécules non protéiques par dialyse simple ou sous tension de l'extrait aqueux brut est donc un problème insoluble puisque ce procédé s'avère ou inefficace ou dénaturant. Il est donc indispensable de procéder à la précipitation préalable des protéines par saturation de l'extrait brut avec le sulfate d'ammonium.

III. SUBSTANCES PHOSPHORÉES ET GLUCIDIQUES ACCOMPAGNANT LES PROTÉINES EN SOLUTION

1. Influence des composés phosphorés sur la solubilisation des protéines par l'eau

Pour préciser le rôle que peuvent jouer les substances organiques phosphorées sur la solubilisation des protéines, les teneurs en phosphore minéral et organique d'extraits diversément riches en protéines ont été déterminées.

En ce qui concerne les extraits, le phosphore total a été dosé après minéralisation de l'échantillon; le phosphore minéral a été évalué directement sur les extraits sans minéralisation préalable.

En ce qui concerne la farine, le phosphore total a été déterminé après minéralisation d'un échantillon; le phosphore minéral a été évalué sur le surnageant prove-

¹ Remarquons ici encore la plus forte proportion d'azote dialysable contenue dans les extraits de farine fraîche. La différence entre teneurs en A+Pg des tableaux 15 et 16 est imputable à la classe de substances azotées non dialysables et non précipitables par le sulfate d'ammonium signalée précédemment.

nant de la centrifugation d'une suspension farine-acide trichloracétique 10% (dans la proportion de 1 g pour 10 ml) après agitation de 10 minutes.

Le phosphore organique extrait, apprécié par différence entre le phosphore total et le phosphore minéral, est vraisemblablement constitué en grande majorité par de la phytine: en effet l'extraction par l'eau de phosphores nucléique et lipidique est négligeable, il resterait à préciser la part de phosphore organique constitué par du phosphore glucidique; cette part est rarement importante. Chez le blé, M^{lle} Moureaux (1965) précise qu'elle n'atteint pas 4% de la quantité du phosphore total.

Les analyses que nous avons effectuées ont porté sur les extraits aqueux en raison de leur sensibilité aux diverses influences étudiées dans le précédent chapitre. Les teneurs en azote et en phosphore minéral et organique de deux séries d'extraits provenant de lots de farines plus ou moins fraîches ont été établies. Parallèlement, les teneurs en phosphore des farines ont été précisées. Les résultats sont groupés dans le tableau 17.

TABLEAU 17

Comparaison des teneurs en azote et en phosphore de farines présentant des durées de conservation extrêmes, et de leurs extraits aqueux (extractions simultanées, effectuées dans des conditions rigoureusement identiques). Les teneurs sont exprimées en % du poids sec de la prise d'essai.

		durée de conservation de la farine	
		0 j.	60 j.
farine	N total	4,4	4,4
	P. total	0,24	0,24
	P. minéral.	0,04	0,04
	P. organique (par différence). .	0,20	0,20
premier extrait	N total	2,42	1,70
	P. total	0,18	0,14
	P. minéral.	0,020	0,035
	P. organique (par différence). .	0,160	0,105

L'extrait de farine fraîche, conformément aux observations du second chapitre, est beaucoup plus riche en azote total que l'extrait de farine conservée (ce dernier toutefois présente une teneur en azote supérieure à celle constatée dans de précédentes expériences sur des farines moins longtemps conservées, mais ceci n'est qu'une manifestation de plus du cycle endogène de la graine dont nous avons parlé précédemment).

Nous constatons que les variations dans les teneurs en azote des extraits sont liées à des variations de même sens dans les teneurs en phosphore organique. Que le

taux de phosphore organique de la farine reste constant dans les deux cas étudiés n'exclut pas la possibilité de rendre la phytine responsable des variations constatées dans la solubilisation des globulines.

Le lien phytine-protéine, pour des pH supérieurs à 3, a été révélé et commenté par plusieurs auteurs, comme nous l'avons exposé dans l'historique. Helliott et Macheboeuf (1947) pensent que la phytine est préexistante dans la graine indépendamment des protéines et forme des complexes avec ces dernières au cours des extractions et des séparations.

Rondelet et Lontie (1955) d'une part, Smith et Rachis (1957) d'autre part, ont montré que la phytine est liée, dans les solutions protéiques, à 1 ou 2 protéines précises. Le fait que la diminution du taux d'azote extrait, liée à la durée de conservation de la farine, atteint un pallier inférieur qui correspond à une constitution protéique presque uniquement albuminique laisse supposer que, dans les cotylédons de dolique, presque toutes les globulines sont engagées dans un complexe hydrosoluble. Le parallélisme entre taux de phytine des extraits et taux de globulines indûment solubilisées par l'eau conduit à penser que ce complexe est une association phytine-globuline. Par ailleurs, la force ionique conférée aux solutions aqueuses par les sels minéraux de la farine est inférieure à 0,085 puisque les solutions de NaCl 0,5% accusent une remontée du taux d'extraction de farines conservées.

Il faut remarquer que les complexes entre phytine et protéines dont parlent les auteurs sont des complexes insolubles, précipités généralement irréversibles apparaissant au cours des opérations d'extraction ou de fractionnement. Le complexe dont nous supposons l'existence est d'autre nature puisqu'il rend au contraire hydrosolubles des protéines qui ne le sont pas. Nos constatations nous conduisent à supposer que ce complexe phytine-protéine est préexistant dans la graine. Lorsque les structures tissulaires de la graine sont bouleversées par la mouture, le complexe se dissocierait plus ou moins rapidement; la phytine libérée ne se dissoudrait plus entièrement (peut-être engagée dans des combinaisons avec Ca^{++} ou Mg^{++}) et les globulines retrouveraient alors leurs exigences propres vis à vis de la force ionique. Celle qui est conférée aux solutions aqueuses par les sels minéraux de la farine est insuffisante pour les solubiliser toutes.

Ainsi, les différences plus ou moins importantes d'hydrosolubilité constatées entre protéines de farine conservée et protéines de farine fraîche sont une manifestation d'un cycle endogène dont le complexe pourrait être un des moteurs.

2. *Élimination de la phytine et des glucides accompagnant les protéines en solution*

Ainsi que nous l'avons exposé dans l'historique, les auteurs ayant étudié cette question sont unanimes à prôner l'élimination de la phytine des extraits protéiques, ce composé étant rendu responsable de précipitations irréversibles, notamment lors de fractionnements par acidification.

Les procédés employés pour éliminer plus ou moins complètement ce composé sont divers et généralement longs, avec risques de dénaturation; les principales voies suivies étant la dialyse prolongée à pH alcalin de l'extrait brut, la chromatographie, etc... Perles, comme nous l'avons relaté, constate que la combinaison phytine-protéine est dissociée par relargage à 0° C: la protéine précipite, l'acide phytique reste en solution et s'élimine par dialyse. Cette méthode paraît judicieuse pour éliminer à la fois la phytine et les autres substances non protéiques dissoutes.

Rondelet et Lontie déconseillent la précipitation ammoniacale du fait d'entraînement irréversible de phytine par le précipité formant alors une association insoluble, et aussi à cause de la longueur des dialyses que ce procédé entraîne. Mais le précipité ammoniacal que nous obtenons se remet intégralement en solution, en outre, la rapidité des opérations de précipitations et de dialyse à laquelle nous parvenons semble devoir annuler les risques de dénaturation.

L'essai suivant rend compte des étapes de l'élimination du phosphore des extraits. Le fractionnement porte sur le premier extrait, par l'eau, d'une farine fraîchement moulue. L'extrait brut fut précipité par le sulfate d'ammonium à saturation; le précipité fut redissous puis électrodialysé contre de l'eau bidistillée pendant 20 heures (l'élimination du sulfate d'ammonium est totale dès 16 heures, les 4 heures supplémentaires garantissent une marge de sécurité); l'adialysat fut alors recueilli quantitativement et dosé.

TABLEAU 18

Taux de phosphore total présent à chaque étape du fractionnement en % du phosphore total de l'extrait ; taux de glucides totaux présents à chaque étape du fractionnement en % des glucides totaux de l'extrait.

	Extrait total	précipitation par le sulfate d'ammonium		Electrodialyse du précipité redissous: non dialysé	Elimination par dialyse
		surnageant	précipité		
Phosphore	100	77,8	22,2	13,8	8,4
Glucides	100	81,8	18,2	10,5	7,7

Nous constatons, (tableau 18), que 78% environ du phosphore extrait est éliminé par précipitation ammoniacale et 38% de ce qui reste est éliminé par dialyse. Finalement, 86% du phosphore extrait est éliminé.

La quantité de sucres non négligeable restant dans les protéines fait partie de la molécule, car les glucides non fortement retenus auraient été éliminés. Pour le phosphore, il est difficile de discerner si les faibles quantités restantes font partie de la molécule ou sont des restes phytiniques fortement liés aux protéines.

CHAPITRE 4

ÉTUDE DES FAMILLES PROTÉIQUES

I. ANALYSE DES FAMILLES PROTÉIQUES

Les deux grandes familles, albumines et globulines, sont définies sans ambiguïté. Elles sont caractérisées essentiellement par leur aptitude à se dissoudre ou non dans l'eau pure. Les difficultés commencent avec le fractionnement de ces familles en entités constitutives.

1. *Facteurs affectant la précipitation des pseudoglobulines*

Rappelons les caractères généraux des pseudoglobulines: insolubilité dans les solutions saturées à 50% par le sulfate d'ammonium et solubilité dans l'eau pure et les solutions salines diluées, coagulabilité par la chaleur et autres agents dénaturants.

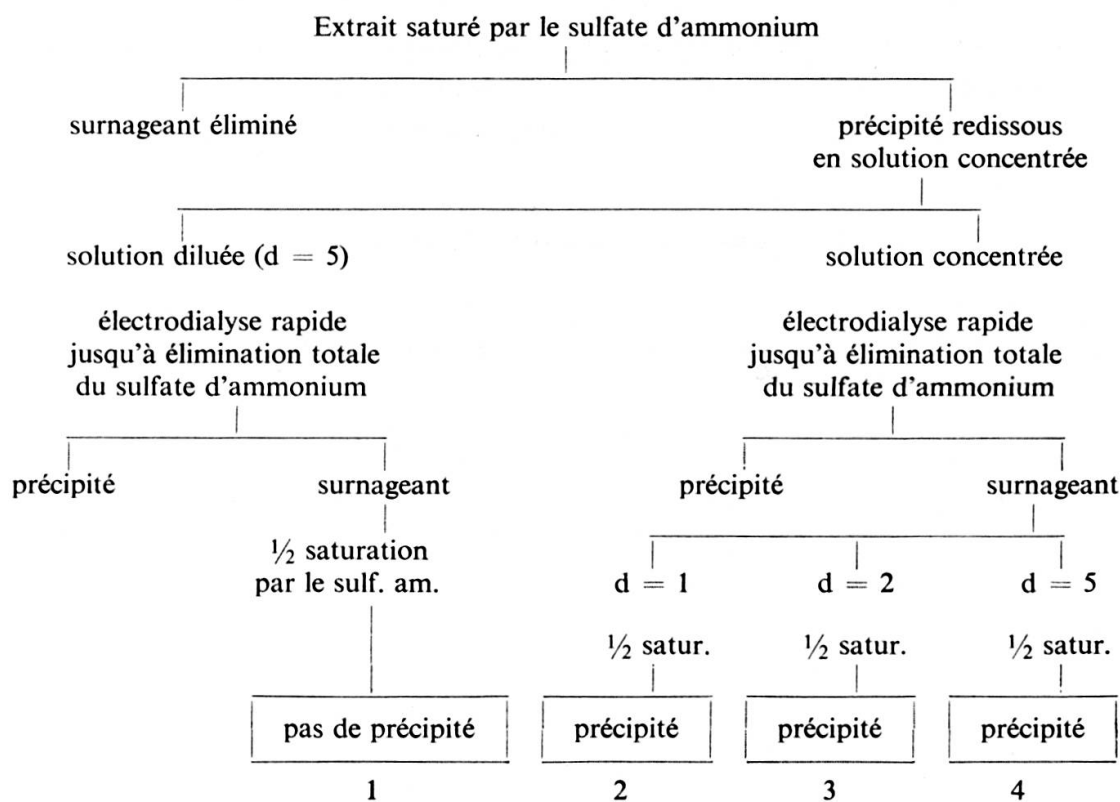
Nous voulions appliquer cette distinction aux protéines cotylédonaires et avons, en effet, isolé une famille répondant à ces caractéristiques. Mais, si nous avons, dans les tableaux du chapitre 3, fait figurer uniquement les teneurs globales en albumines et pseudoglobulines au lieu d'exprimer les teneurs respectives en chacune de ces familles, c'est que nous avons constaté des défauts dans la reproductibilité de la précipitation des pseudoglobulines.

Dans certains cas, aucun précipité ne se forme par demi-saturation du surnageant provenant de la centrifugation des extraits dialysés, que la dialyse ait été appliquée directement aux extraits ou qu'elle ait eu lieu après précipitation préalable des protéines par le sulfate d'ammonium à saturation. Ce fait se constate aussi bien dans le cas de dialyses simples que d'électrodialyses. Il se constate également sur des extraits provenant de farines fraîchement moulues aussi bien que sur d'autres provenant de farines conservées, dans le cas de graines jeunes que dans celui de graines âgées.

L'influence de la concentration des protéines dans la solution mère a tout d'abord été soupçonnée. Il semble cependant que l'explication ne soit pas si simple, ainsi que le montrent les résultats de l'essai suivant: un extrait aqueux de farine fraîchement moulue a été saturé par le sulfate d'ammonium. Le précipité, redissous dans très peu d'eau, a été dialysé. Après séparation des globulines, le surnageant a été fractionné en plusieurs parts. La précipitation des pseudoglobulines a été effectuée sur une part non diluée, puis sur les autres ayant subi des dilutions croissantes. A toutes les dilutions, les pseudoglobulines ont précipité. Le même essai fut alors recommencé, mais en effectuant la dilution avant la dialyse selon le schéma suivant:

SCHÉMA 4

Recherche de l'influence de la concentration avant dialyse sur la précipitation des pseudoglobulines



Au moment de la demi-saturation par le sulfate d'ammonium, les solutions des cas nos 1 et 4 présentent exactement la même concentration en protéines et en sulfate d'ammonium, or seule la solution n° 4 donnera lieu à une précipitation.

Ainsi, il apparaît que les pseudoglobulines ne supportent pas la dialyse, même rapide, en solution diluée. Elles précipitent et grossissent alors artificiellement le lot des globulines. C'est donc une dénaturation, favorisée par la dilution, qui détermine l'absence d'apparition des pseudoglobulines dans certains cas et non la dilution elle-même.

Cette fragilité des pseudoglobulines révélée ici a, par ailleurs, été constatée lors d'essais de purification à partir de solutions suffisamment concentrées avant dialyse, la purification avait lieu de la manière suivante: le précipité de pseudoglobuline était dissous, électrodialysé puis reprécipité par demi-saturation. A chaque répétition de cette opération, lors de la dialyse, une nouvelle quantité de pseudoglobuline précipitait irréversiblement.

L'étude électrophorétique permettra de mieux percevoir les liens de parentés qui unissent cette famille aux albumines. La conclusion qui s'impose actuellement est que la distinction albumine-pseudoglobuline telle qu'elle est pratiquée sur les protéines d'origine animale ne peut être appliquée aux protéines de graines. La

concentration protéique n'est pas, en effet, un paramètre variable dans les humeurs d'origine animale (serum, lait, œuf, ...). Par contre, les protéines de graines subissent une extraction préalable des modalités de laquelle dépend la concentration des solutions protéiques obtenues. Désormais nous ne distinguerons plus les pseudoglobulines des albumines que dans certains cas particuliers; le terme général famille albuminique englobera les albumines et les pseudoglobulines, c'est-à-dire les protéines solubles dans l'eau pure et les solutions salines diluées.

2. Constitution des familles protéiques

Les teneurs en azote, phosphore et sucres des 3 familles que nous avons définies au début de ce travail ont été déterminées et figurent dans le tableau 19.

TABLEAU 19

Teneur en azote, phosphore et glucides des albumines, pseudoglobulines et globulines exprimées en pourcentage du poids sec de la protéine.

	A	Pg	G
N	14,8	18,0	15,8
P	0,06	0,07	0,28
Glucides	8,8	2,1	6,0

La famille albumique (albumines, pseudoglobulines) ne contient que des traces de phosphore. Par contre, les globulines en possèdent des teneurs beaucoup plus importantes.

Certains auteurs attribuent la présence de phosphore trouvé dans les globulines à des impuretés entraînées lors de la précipitation. Nous pensons plutôt que ce phosphore fait partie de la molécule. Nous avons vu que la précipitation par le sulfate d'ammonium et la dialyse éliminent les impuretés éventuelles. Les auteurs situent d'ailleurs la fixation des impuretés phosphorées sur le précipité au niveau de la première précipitation par le sulfate d'ammonium, une partie du précipité présentant une très forte teneur en phosphore serait alors rendue définitivement insoluble. Nous n'avons, quant à nous, constaté aucune insolubilisation définitive à cette étape. Tout le précipité se remet intégralement en solution; rien ne s'oppose alors à l'élimination des impuretés par dialyse.

En comparant la constitution des albumines et des pseudoglobulines, des contrastes intéressants apparaissent. Les taux de sucres présentent des valeurs

extrêmes: les albumines sont les plus riches de toutes les protéines cotylédonaires, les pseudoglobulines les plus pauvres. A cette faible teneur en sucre des pseudoglobulines correspond une forte teneur en azote. Or, nous savons que la présence de fortes quantités de sucres dans une molécule protéique lui confère souvent une grande stabilité. L'inverse peut se vérifier dans certains cas et il est permis de voir dans la relative absence de glucides chez les pseudoglobulines une des raisons de leur grande instabilité.

3. *Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique des familles protéiques*

Les électrophorèses ont eu lieu sur gel d'agar ou d'agarose, de concentration 1,5%, et tamponné à pH 8,6 par un mélange véronal acide-véronal sodique de force ionique 0,033.

a) *Albumines*

Contrairement aux albumines sériques qui, soumises à l'électrophorèse dans les mêmes conditions, sont homogènes et accusent une forte mobilité anodique, les albumines cotylédonaires de dolique sont très hétérogènes et ont des mobilités, à la fois anodiques et catodiques, très diverses de presque nulle à très forte (figure 6). On dénombre 7 fractions anodiques et 2 catodiques.

L'analyse immunoélectrophorétique confirme la grande complexité des albumines (11 arcs sont dénombrés, figure 16, chapitre 5).

b) *Pseudoglobulines*

Alors que l'étude des proportions des constituants élémentaires révèle d'importantes différences entre les albumines et les pseudoglobulines, l'observation des électrophorégrammes permet de constater une grande identité comme en témoigne la figure 7 représentant une électrophorèse des deux familles effectuée sur la même lame donc dans des conditions absolument identiques.

Une autre constatation dénote également une parenté structurale entre albumines et pseudoglobulines: l'immunserum antipseudoglobulines réagit positivement avec les albumines et l'immunserum antialbumines réagit de même avec les pseudoglobulines.

L'étroite parenté des deux familles révélée par la similitude de comportement antigénique et électrophorétique est encore renforcée par la similitude des pH de solubilité minimum (zone de 4,9 à 5,2).

Cette grande similitude entre albumines et pseudoglobulines permet l'hypothèse suivante: nous avons vu que les albumines sont assez riches en glucides. Chaque fraction pourrait avoir son homologue presque dépourvu de sucres, par là moins stable, apte alors à précipiter dans certaines conditions par le sulfate d'ammonium

à $\frac{1}{2}$ saturation, alors que les albumines exigent des solutions saturées. La précipitation spontanée de ces fractions pauvres en glucides serait progressive et dénaturante

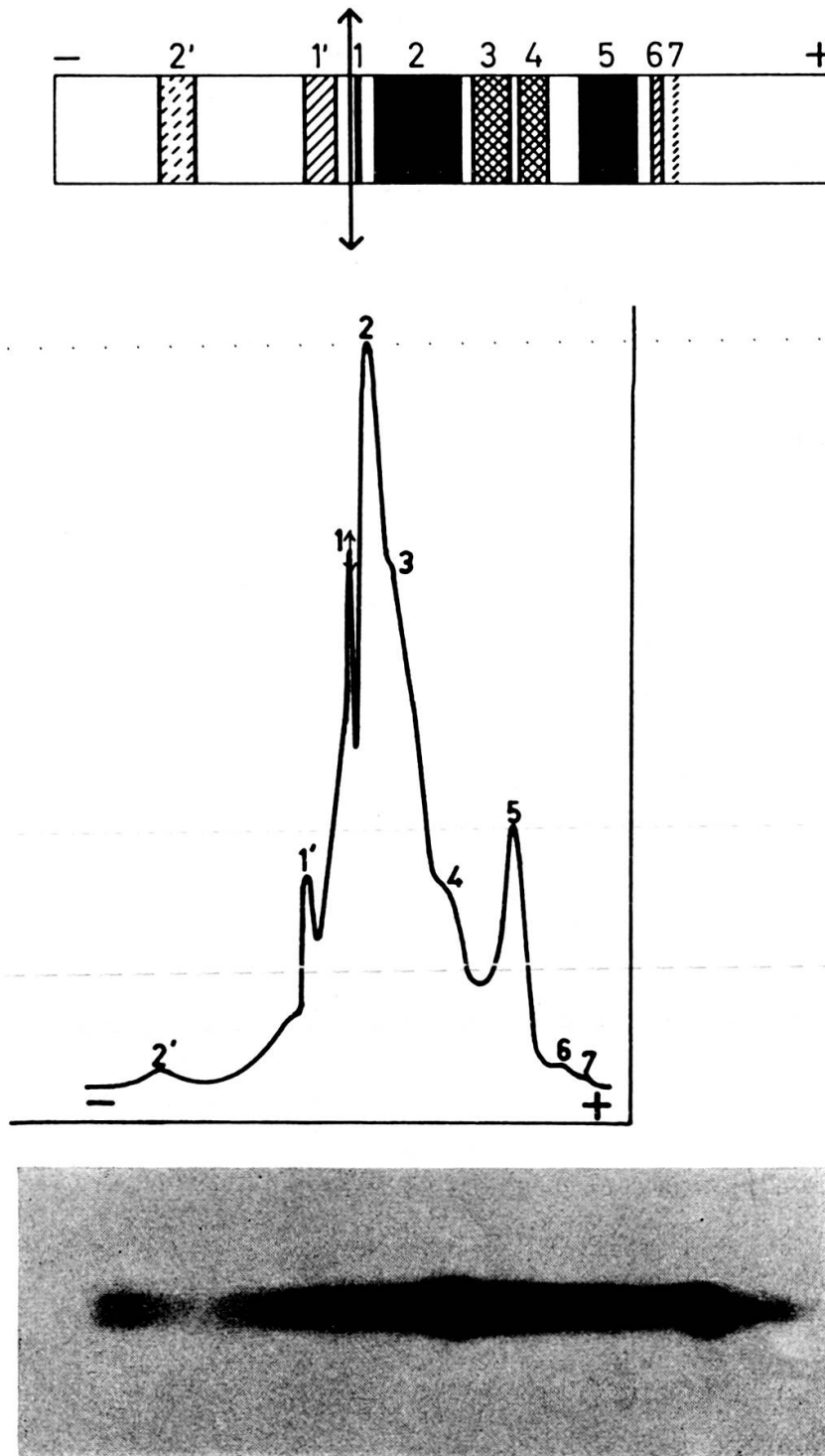


FIG. 6. — Diagramme électrophorétique et courbe densitométrique des albumines.

au cours de dialyses comme nous l'avons vu et comme le confirme l'essai de purification suivant.

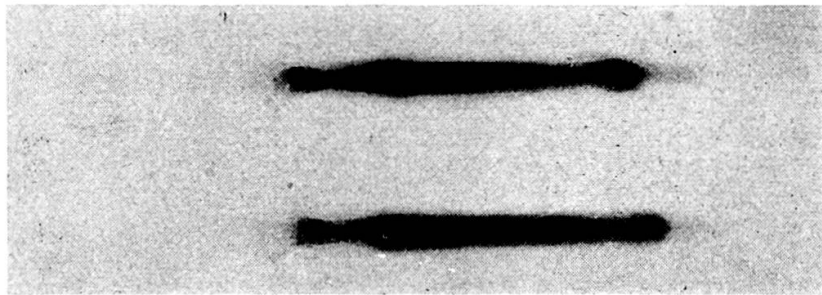
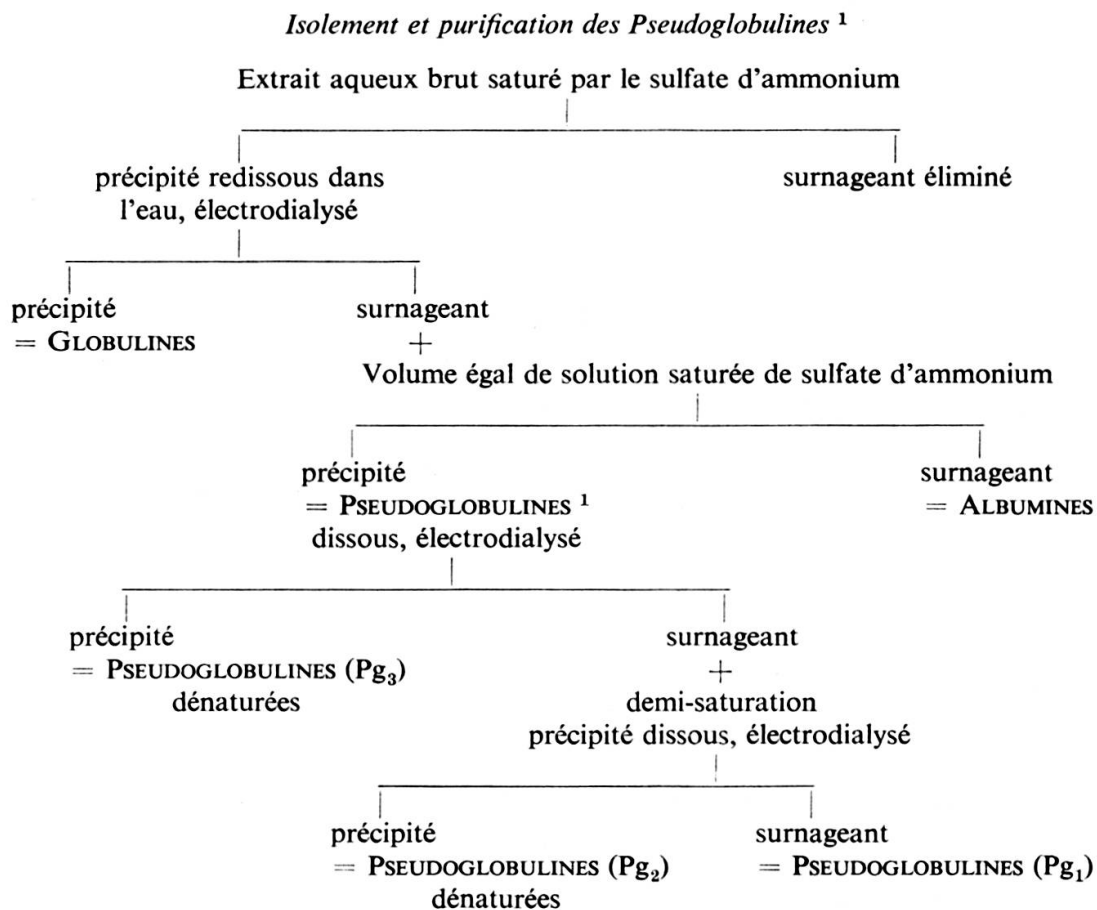


FIG. 7. — Diagramme d'électrophorèses simultanées des albumines et des pseudoglobulines.

Cet essai porte sur la solution albuminique totale, les opérations d'isolement et de purification ¹ des pseudoglobulines sont résumées dans le schéma 5.

SCHÉMA 5



¹ Une purification moins poussée mais plus rapide des pseudoglobulines peut être obtenue en lavant le précipité de pseudoglobulines avec une solution demi-saturée de sulfate d'ammonium. La purification pratiquée ici permet de confirmer l'instabilité de cette famille.

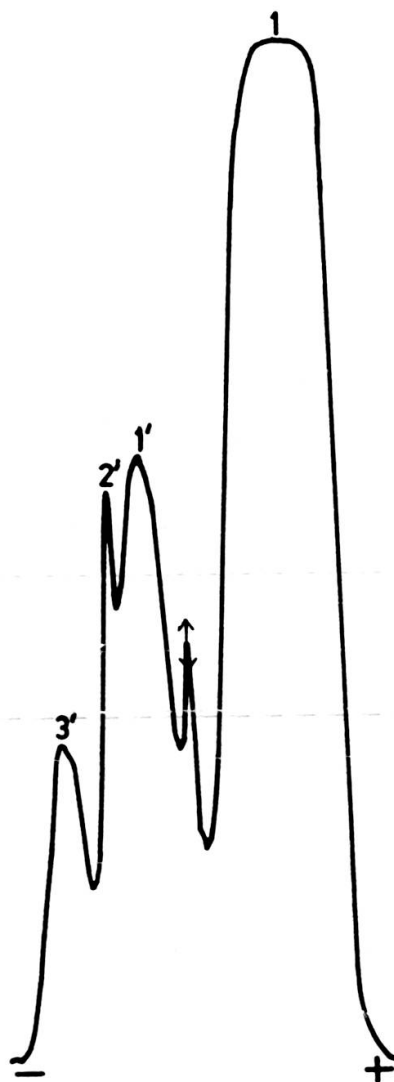
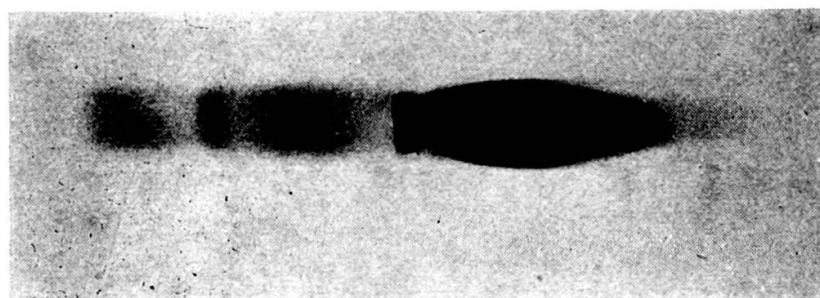


FIG. 8. — Electrophorégramme et courbe densitométrique des globulines.

La formation des précipités que nous appelons Pg_2 et Pg_3 est anormale puisque les pseudoglobulines, de même que les albumines qui peuvent souiller le précipité de départ, sont solubles dans l'eau pure. Ces précipités correspondent donc à une dénaturation. Ils sont, en effet, irréversibles. A la fin, il ne reste en solution qu'un tiers environ des pseudoglobulines de départ. Or le diagramme de ces pseudoglobulines restantes est en tous points identique à celui des pseudoglobulines initiales, aucune fraction n'en est absente. Ce ne sont donc pas des fractions particulières qui se sont dénaturées, mais une partie, semble-t-il, de toutes les fractions constitutives.

c) *Globulines*

La complexité des globulines totales est révélée par la figure 8. Trois fractions catodiques sont bien distinctes. La tache majeure anodique groupe certainement plusieurs fractions confondues. Son importance quantitative est considérable comme

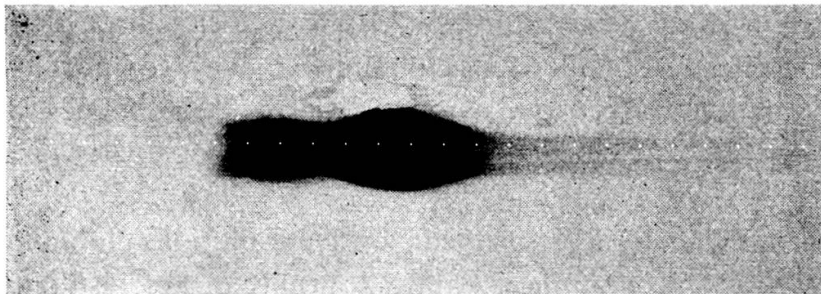


FIG. 9. — Diagrammes d'électrophorèses rapides (15 minutes) des globulines.

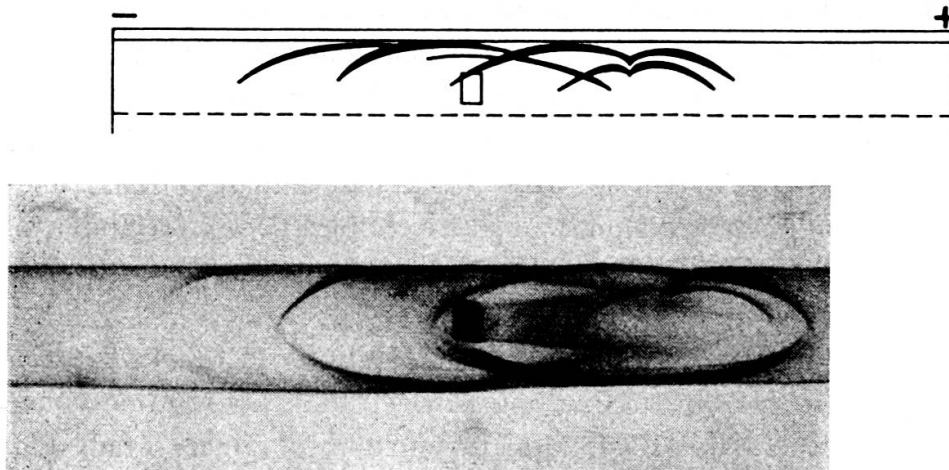


FIG. 10. — Immuno électrophorégrammes des globulines diffusées contre 2 immunserum antiglobulines (2 lapins différents).

le montre la courbe densitométrique dont l'intégration des surfaces permet de préciser les rapports suivants: 1:76%; 1':12%; 2':5%; 3':7%.

Une seconde fraction anodique d'une extrême mobilité passe inaperçue sur la plupart des diagrammes. Pour la révéler, il faut limiter les électrophorèses à des durées très brèves. Les autres fractions sont alors encore très indistinctes les unes des autres (figure 9).

L'examen de l'immunoélectrophorégramme des globulines (figure 10) permet de distinguer, pour la fraction majeure anodique, au moins 5 entités différentes, ce qui porterait à un minimum de 9 le nombre de fractions globuliniques.

II. FRACTIONNEMENT DES FAMILLES PROTÉIQUES

1. Fractionnement des globulines par voie chimique

La famille globulinique se prête généralement bien à une séparation par précipitation fractionnée à l'aide d'une saturation progressive en sulfate d'ammonium.

Le fractionnement appliqué aux globulines totales comportait, en première étape, une précipitation isoélectrique par acidification, les globulines restantes étaient alors précipitées successivement par saturation progressive avec le sulfate d'ammonium.

Deux essais ont eu lieu successivement sur deux solutions globuliniques de même force ionique ($\frac{\Gamma}{2}=0,3$), l'une diluée, l'autre concentrée. Les résultats obtenus sont différents dans les deux cas. Les opérations de fractionnement appliquées respectivement aux solutions concentrée et diluée sont résumées dans le schéma 6.

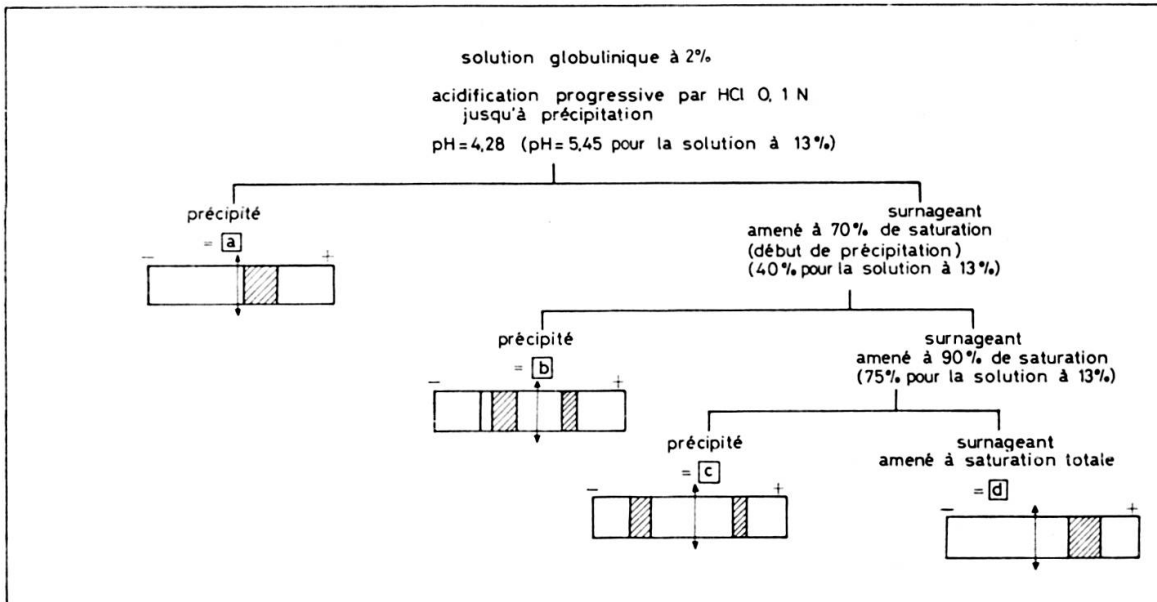
Nous constatons qu'en solution concentrée la précipitation des globulines commence pour une saturation de 40% en sulfate d'ammonium alors qu'en solution diluée, il faut aller jusqu'à 70%. Une valeur intermédiaire du degré de saturation minimum précipitant a été constatée dans le cas d'une solution globulinique de concentration moyenne. Ainsi, il apparaît que la distinction de certaines globulines, faite par beaucoup d'auteurs et basée sur la détermination de la zone de saturation des solutions de sulfate d'ammonium susceptibles de les précipiter, est ambiguë et ne peut avoir de valeur que complétée par la détermination de la concentration des solutions protéiques mères.

L'influence de la concentration des solutions mères se fait également sentir sur la valeur du pH de précipitation isoélectrique. En solution concentrée, la précipitation commence à pH 5,45 alors qu'en solution diluée, il faut descendre jusqu'à pH 4,28. Si l'on admet que les protéines ne modifient pas de façon sensible la force ionique des solutions, les variations constatées sont bien dues aux différences de concentration protéique. Nous avons constaté par ailleurs que les variations de force ionique des solutions protéiques influencent les valeurs du pH de solubilité minimum. Pour une même concentration protéique, nous avons trouvé à $\frac{\Gamma}{2} = 0,3$ un pH de solubilité minimum de 5,1 et à $\frac{\Gamma}{2} = 0,7$ un pH de 3,8. On peut en conclure

que les globulines sont plus stables en solutions lorsqu'elles sont dissoutes à faible concentration dans des solutions de force ionique assez élevée ($\geq 0,68$).

SCHÉMA 6

Fractionnement* appliqué à une solution diluée de globulines (2%) et à une solution concentrée (13%)



Seules la fraction isoélectrique et celle précipitée par le sulfate d'ammonium à saturation sont homogènes. Elles appartiennent à la fraction anodique majeure. Les autres sont composées d'un mélange d'une fraction anodique et d'une autre catodique.

2. Fractionnement des familles protéiques par chromatographie sur DEAE cellulose

Le pH de solubilité minimum, qui est généralement le reflet du point isoélectrique, se situe, pour les familles analysées globalement, aux alentours de 5 ou plus bas. Certaines fractions mineures ont cependant un point isoélectrique beaucoup plus élevé puisque des électrophorèses effectuées à pH 8,6 révèlent encore des fractions à migration catodique dans l'une et l'autre famille. Néanmoins, une chromatographie sur cellulose anionique avec élution par gradient de concentration saline devrait permettre une bonne séparation de la plupart des fractions.

Les deux familles, albumines et globulines, furent soumises à une chromatographie sur colonne de DEAE cellulose.

* Les précipités sont purifiés ainsi: a — par dissolution à pH7 et reprécipitation par acidification; b, c, d — par lavage avec une solution de sulfate d'ammonium saturée au même degré que celui de la première précipitation.

a) *Albumines*

Les meilleurs résultats furent obtenus en combinant l'action de deux gradients l'un de force ionique et l'autre de pH.

Le chromatogramme figure 11, révèle 4 pics. principaux.

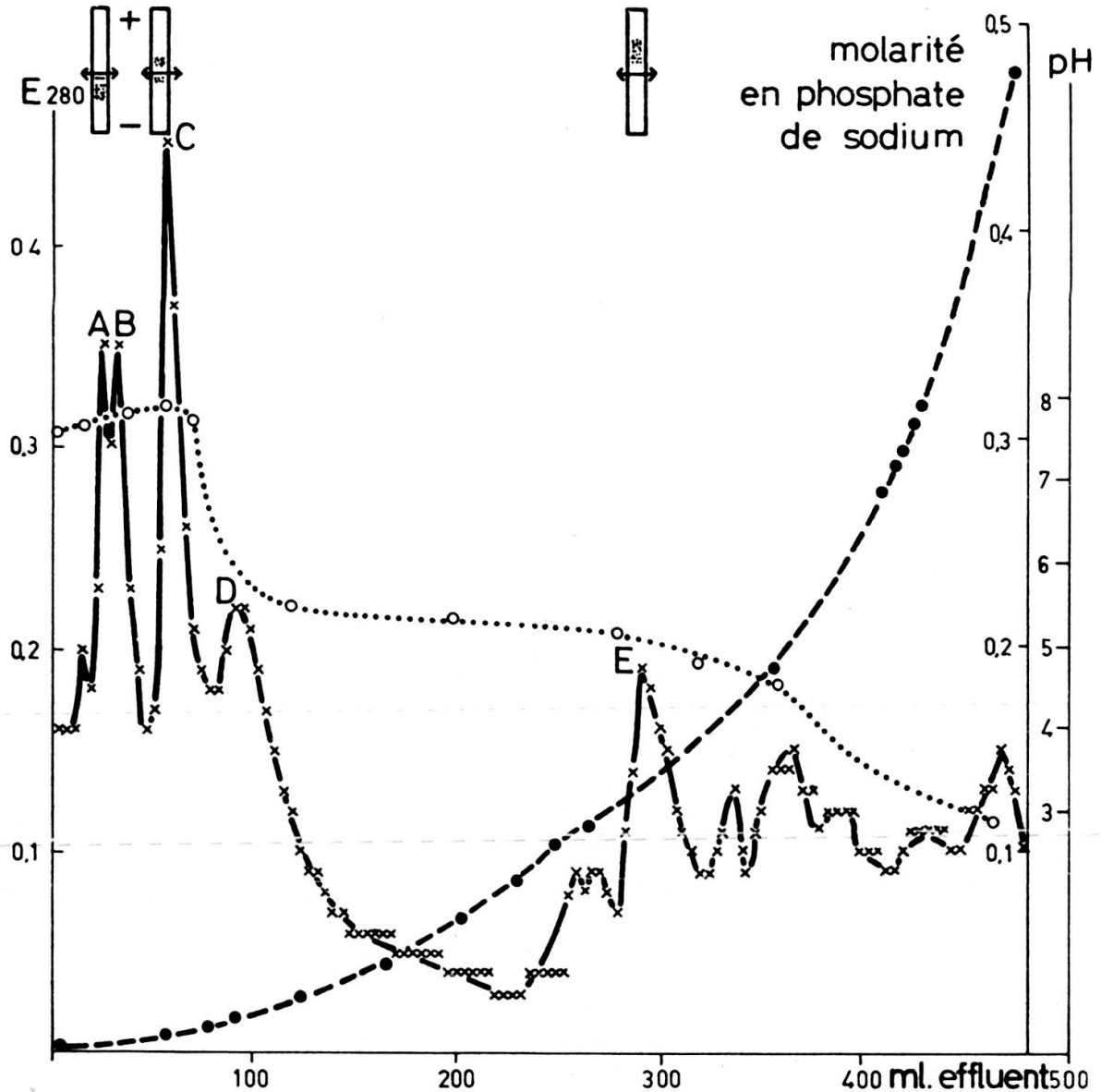


FIG. 11. — Chromatographie des albumines sur DEAE cellulose.

Colonne: 1,5 cm × 30 cm. Protéines appliquées: 80 mg. Taux de protéines récupérées: 71%.

Effluent: 500 ml par fractions de 4 ml.

Gradient mixte, à allure exponentielle, de force ionique et de pH réalisé à l'aide de 2 tampons suivants:

1) Tampon phosphate 0,005 M pH 7,5.

2) Tampon phosphate 0,5 M pH 3.

x ——— x Chromatogramme.

● - - - - ● Gradient de force ionique.

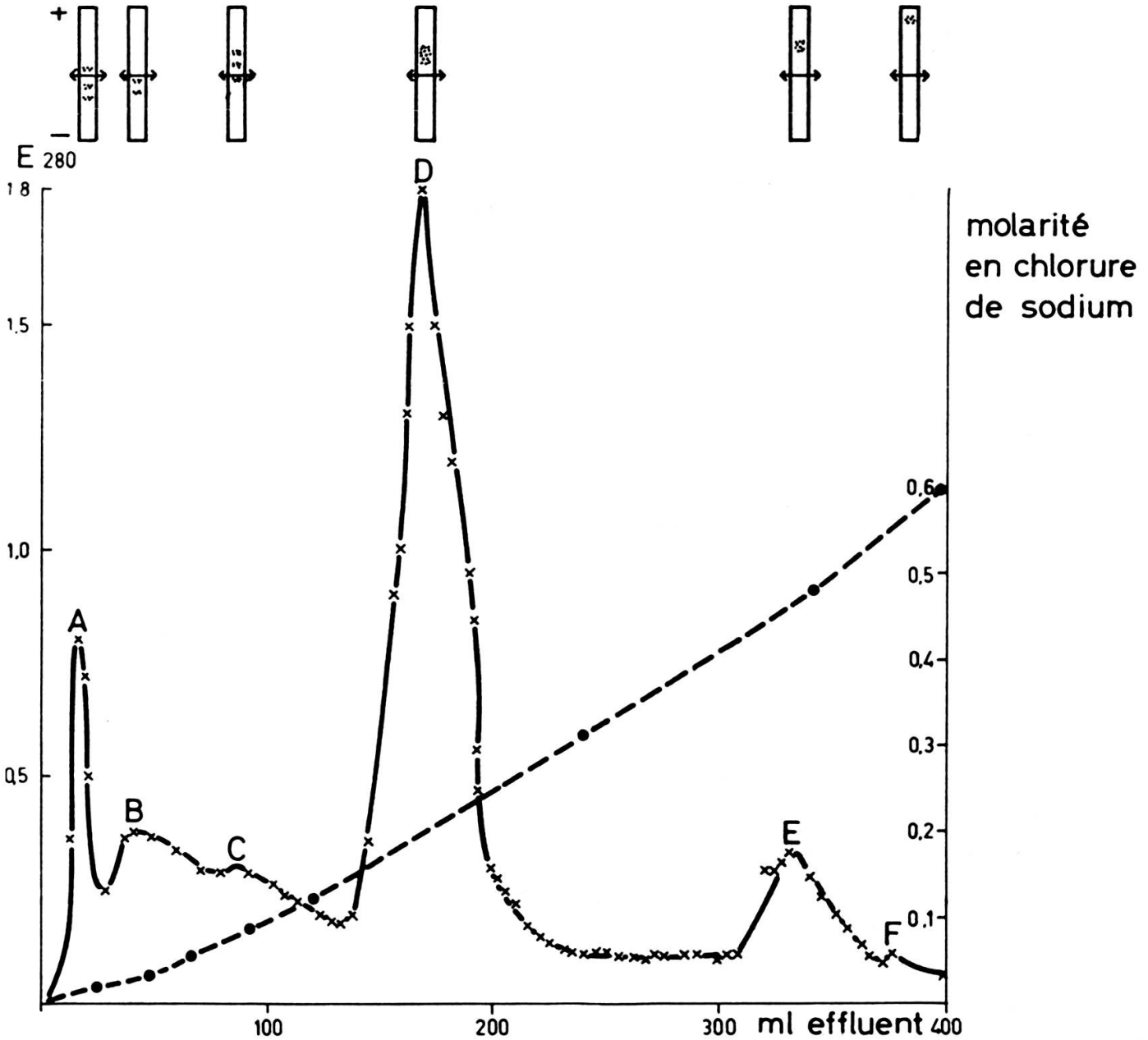
○ ○ Gradient de pH (mesuré à la sortie de la colonne).

On notera que la courbe représentant le gradient de pH obtenu à la sortie de la colonne s'écarte, surtout au début, de la forme que théoriquement elle devrait avoir.

On note en effet une augmentation du pH qui ne s'explique que par l'interférence des protéines éluées.

b) Globulines

Un premier fractionnement, mettant en jeu un gradient linéaire de concentration saline, a montré que la majorité des globulines sont élués pour une concentration en NaCl < 0,1 M. Un étalement de cette zone a été réalisé en donnant au gradient



* L'électrophorégramme schématisé au niveau du pic A compte une erreur accidentelle: la fraction anodique est en réalité cathodique et doit figurer juste sous la ligne de départ.

FIG. 12. — Chromatographie des globulines sur DEAE cellulose.
 Colonne: 1 cm × 18 cm. Poids de protéines appliquées: 150 mg.
 Taux de protéines récupérées: 69%. Effluent: 400 ml par fractions de 3 ml.
 x—x Chromatogramme.
 ●- - - -● Gradient de force ionique.

une allure exponentielle. Les petites fractions (figure 12) peuvent alors être séparées, en particulier de la globuline majeure.

Les pics A et B, élués pour une concentration en chlorure de sodium de 0,015 M et 0,03 M correspondent, le premier à 3 fractions catodiques, le second à 2 fractions catodiques. Les fractions anodiques mineures sont éluées pour un seuil de concentration d'environ 0,08 M. La fraction anodique majeure, apparemment homogène, est éluée pour une concentration d'environ 0,2 M. Une fraction anodique importante, de mobilité électrophorétique sensiblement identique, est éluée à plus forte concentration: 0,45 M environ. Un léger accident de la courbe constaté à forte concentration

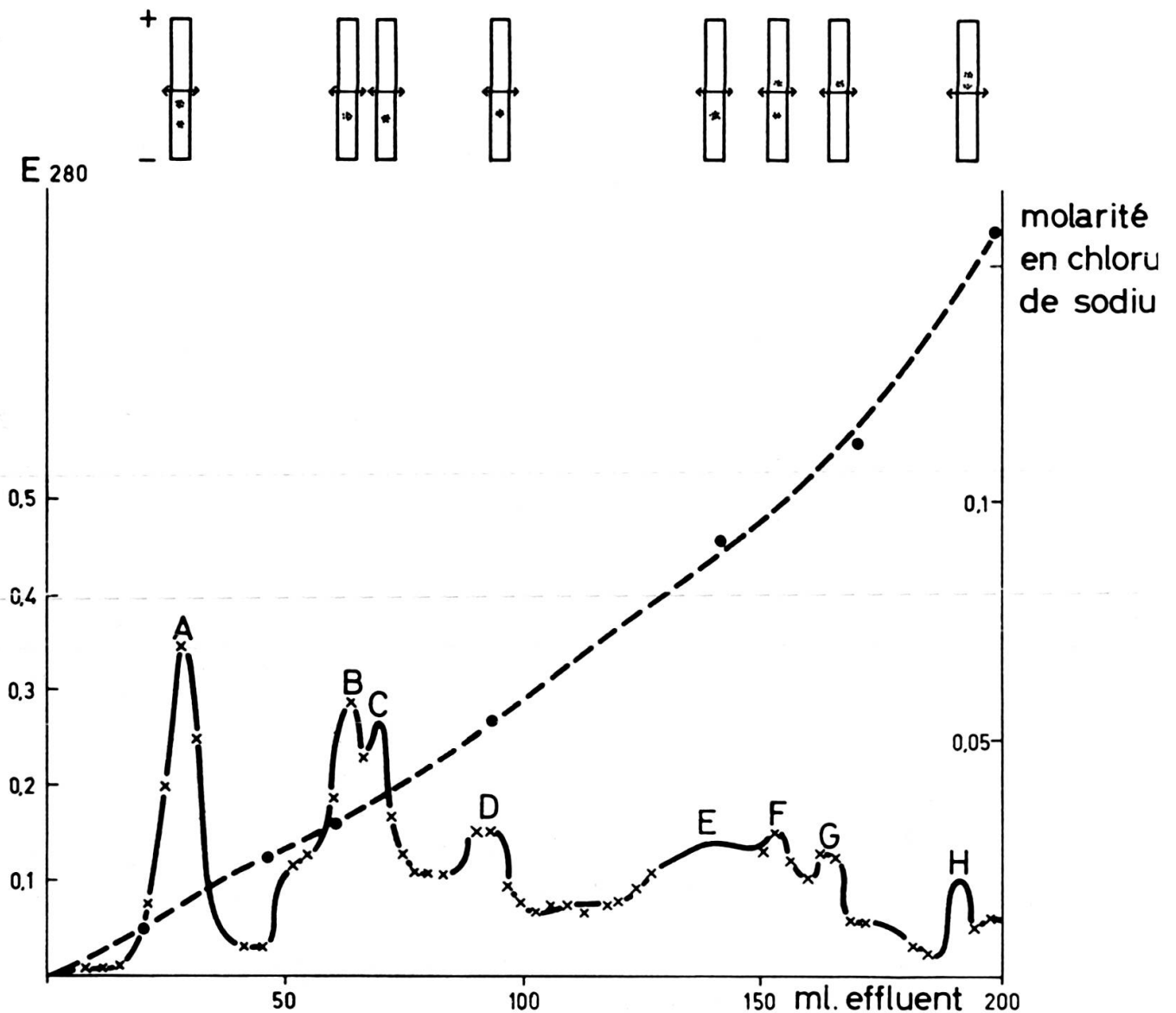


FIG. 13. — Chromatographie des globulines sur DEAE cellulose.

Colonne: 1 cm × 18 cm. Poids de protéines appliquées: 85 mg.

Taux de protéines récupérées: 20%. Effluent: 200 ml par fractions de 3 ml.

Gradient de concentration saline d'allure exponentiel allant de 0 à 0,17 M.

x ——— x Chromatogramme.

● - - - - ● Gradient de force ionique.

saline, 0,55 M environ, semble correspondre à la fraction mineure anodique très mobile déjà mentionnée.

Un étalement encore plus large de la zone d'éluion à faible force ionique (figure 13) laisse supposer que les fractions anodiques, qui sur électrophorégramme global, semblent n'être que 3, seraient en réalité plus nombreuses et de propriétés si voisines que leur déplacement de l'absorbant par le chlorure de sodium s'effectue pour des valeurs très voisines de la concentration saline.

Nous constatons ici que la transition entre l'éluion des fractions anodiques et celle des fractions catodiques se produit pour une valeur de concentration saline sensiblement égale à celle observée dans la figure 2 (0,09 M environ).

CHAPITRE 5

ÉTUDE DES PROTÉINES DE L'AXE GERMINATIF

La nature même et la destinée si différentes des deux parties de la graine conduisent à supposer que les protéines présentes dans ces organes sont dissemblables par leur constitution et leur fonction. L'étude des protéines de l'axe, succédant à celle des cotylédons et conduite suivant des procédés analogues, permettra de mieux connaître les protéines de cet organe, contenant principalement, peut-on penser, des protéines de constitution, en les comparant à celles des cotylédons considérées comme protéines de réserve.

I. CARACTÉRISTIQUES DU GERME

TABLEAU 20

Teneurs de la farine d'axe en azote, phosphore, glucides et lipides exprimées en % du poids sec de la farine.

	Azote	Phosphore	glucides	Lipides
Axe	8,40	0,80	40,00	5,20
Cotylédons	4,40	0,22	69,00	0,50

L'axe (tableau 20) est près de 4 fois plus riche en phosphore que les cotylédons bien qu'il ne soit que 2 fois plus riche en azote. En outre, il contient une quantité non négligeable de lipides.

Ces caractéristiques rendent compte de la différence de nature de ces organes, l'axe étant riche en protéines de structure.

TABLEAU 21

Nature des glucides contenus dans la farine d'axe

Les teneurs sont exprimées en % du poids sec de la farine et comparées aux valeurs similaires des cotylédons.

	glucides totaux	glucides solubles	amidon	glucides non extraits
Axe	40	32	traces	7
Cotylédons	69	14	42	13

Les différentes formes sous lesquelles se trouvent les glucides montrent (tableau 21) que l'axe germinatif contient peu de glucides de réserve; cependant des zones à amidon ont été révélées cytochimiquement dans certains tissus.

II. EXTRACTION DES PROTÉINES

1. *Bilan d'une extraction totale*

Afin de connaître la nature des familles protéiques contenues dans l'axe et, en même temps, les proportions relatives de ces familles, des extractions totales, par l'intervention successive des trois solvants classiques appliqués aux cotylédons (eau, solutions salines, solutions alcalines diluées), ont été conduites suivant les mêmes modalités (dilution $d = 15$).

Deux extractions menées parallèlement, faisant intervenir l'une l'eau en premier solvant, l'autre les solutions salines, permettent de déterminer également quel est le meilleur mode d'extraction.

Les résultats sont exprimés figure 14 .

Le graphique révèle deux singularités: les points A et B.

A —Le taux du 5^e extrait est supérieur à celui du 4^e. Lorsque NaCl agit en premier solvant, ce minimum n'existe pas. Cela indiquerait la présence d'une fraction de prolamine soluble dans l'eau pure (et dans l'alcool à 70°). Cette fraction n'existait pas chez les cotylédons. De telles prolamines, légèrement solubles dans l'eau pure, ont été signalées par plusieurs auteurs et notamment par Baudet et Mossé (1962*b*).

B —Les taux cumulés d'extraction par épuisement à l'aide des deux premiers solvants ne sont pas égaux, contrairement à ce que l'on constatait chez les cotylédons. L'avantage, comme le révèle le tableau 22, est pour le système eau-NaCl.

TABLEAU 22

Comparaison des taux d'azote extrait à chaque étape, exprimés en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai

étapes \ ordre des solvants	Eau-NaCl-NaOH	NaCl-eau-NaOH
N total extrait par le premier solvant.	73,0	75,1
N total extrait par le deuxième solvant.	8,8	3,6
N total extrait par les deux premiers solvants	81,8	78,7

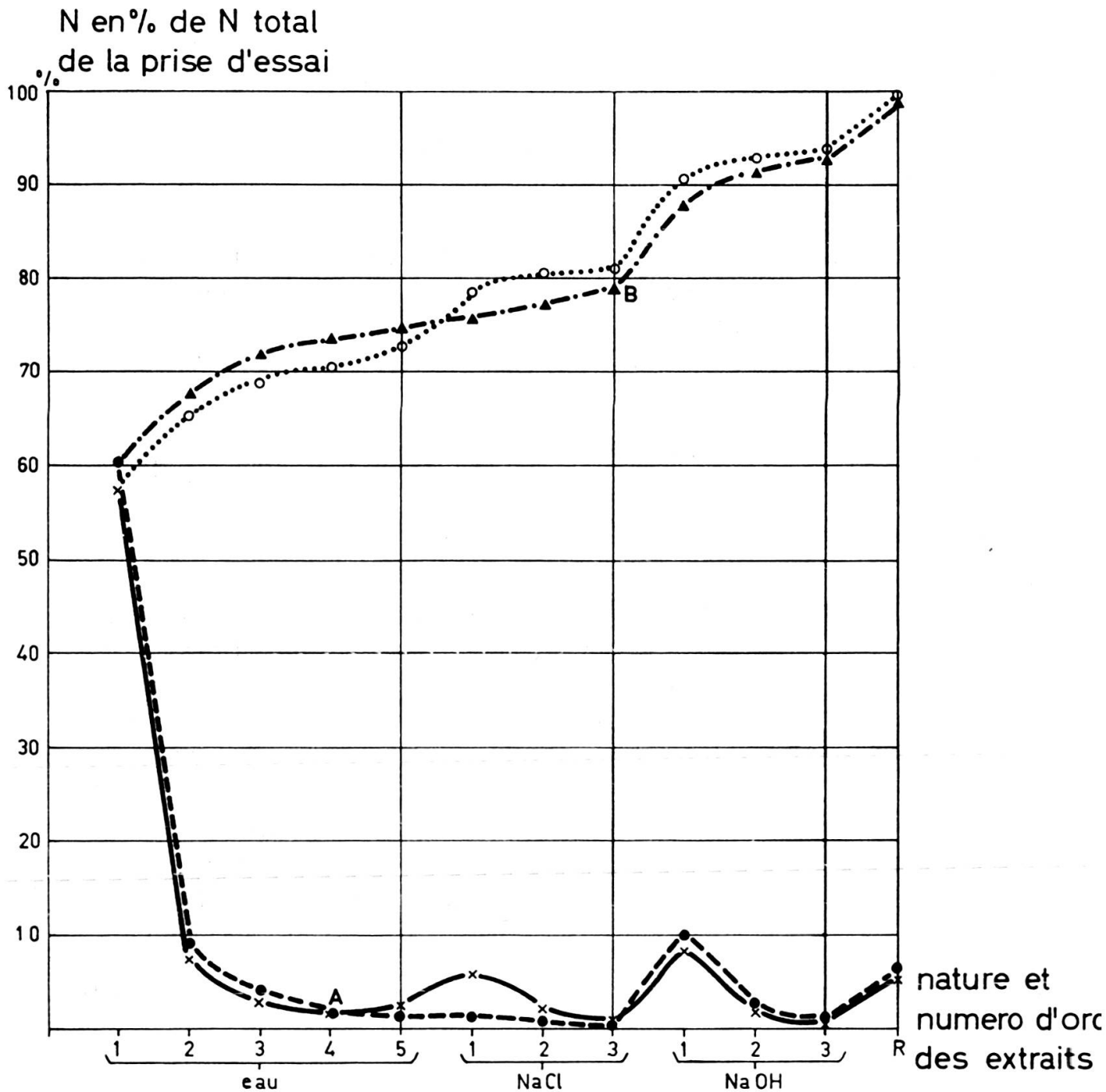


FIG. 14. — Comparaison de 2 extractions totales utilisant :
l'une l'eau en premier solvant, l'autre le chlorure de sodium.

- Variation des teneurs des extraits en azote total en fonction de la nature et du numéro d'ordre de chaque extrait.
- Comparaison des valeurs cumulées.

- x — x Azote total de chaque extrait lorsque l'eau agit en premier solvant.
- o - - - o Valeurs cumulées de l'azote total extrait à chaque étape lorsque l'eau agit en premier solvant.
- - - - ● Azote total de chaque extrait lorsque le chlorure de sodium agit en premier solvant.
- ▲ — — ▲ Valeurs cumulées de l'azote total extrait à chaque étape lorsque le chlorure de sodium agit en premier solvant.

Ainsi, le mode d'extraction faisant intervenir les solutions salines en premier accuse un léger avantage, à fin de la première étape, sur le mode d'extraction faisant agir d'abord l'eau. Mais à la fin de la deuxième étape, c'est ce dernier mode qui vient en tête pour le rendement et il y demeure jusqu'à la fin de l'extraction bien que le troisième solvant (NaOH) ait sensiblement rétabli l'équilibre.

Ces constatations confirment l'existence d'une fraction prolamine, soluble dans l'eau pure.

Si nous comparons ces résultats aux extractions cotylédonaires similaires, nous constatons l'existence, propre au germe, d'une prolamine quantitativement peu importante (3% environ de l'azote total de la farine), soluble dans l'eau pure. Par ailleurs, le taux d'azote résiduel, bien qu'encore relativement faible, est plus élevé que pour les cotylédons (6% contre 1,5%).

L'existence de cette fraction a été confirmée par extraction à l'aide de son solvant propre, l'alcool à 70°.

2. Substances phosphorées et glucidiques accompagnant les protéines dans les extraits

Le fractionnement conduisant à l'isolement, à partir des extraits, des 2 familles: albumines et globulines, a été appliqué aux extraits de farine d'axes suivant le même schéma que celui appliqué aux extraits cotylédonaires (schéma 1).

La teneur en glucides totaux et phosphore total des extraits a été déterminée. L'efficacité de l'élimination de ces substances à la suite des opérations de fractionnement peut être contrôlée par l'examen du tableau 23.

TABLEAU 23

Proportions relatives des constituants phosphorés et glucidiques à chaque étape du fractionnement du premier extrait aqueux. Les teneurs sont exprimées en pourcentage du poids sec de la prise d'essai et comparées aux valeurs analogues cotylédonaires.

		Extrait total	Précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation		Electrodialyse du précipité redissous	Elimination par dialyse
			surnageant	précipité		
axe	Azote	5,00			3,30	
	Phosphore	0,60	0,40	0,20	0,18	0,02
	Glucides	29,00	23,70	5,30	2,63	2,67
cotylédons	Azote	2,60			2,04	
	Phosphore	0,18	0,14	0,04	0,025	0,015
	Glucides	11,00	9,00	2,00	1,16	0,84

On remarque tout d'abord que, proportionnellement à la quantité d'azote solubilisé, le taux de phosphore des extraits d'axes est près de deux fois supérieur à celui des extraits de cotylédons. La teneur en glucides accuse elle-même un léger avantage.

On constate ensuite que les glucides et les matières phosphorées accompagnant les protéines dans les extraits s'éliminent en grande majorité dès la première étape d'isolement des protéines, comme cela avait été constaté sur les extraits cotylédonaire, à un degré moindre toutefois ici en ce qui concerne les matières phosphorées, comme le précise le tableau 24.

TABLEAU 24

Taux de phosphore et de glucides totaux présents à chaque étape du fractionnement en pourcentages respectivement du phosphore total et des glucides totaux de l'extrait. Les valeurs analogues cotylédonaire sont rappelées à titre comparatif.

		Extrait total	Précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation		Electrodialyse du précipité redissous (% après dialyse)	Elimination par dialyse
			surnageant	précipité		
axe	Phosphore	100	66,7	33,3	30,0	3,3
	Glucides	100	81,7	18,3	9,1	9,2
cotylédons	Phosphore	100	77,8	22,2	13,8	8,4
	Glucides	100	81,8	18,2	10,5	7,7

L'élimination des glucides est analogue sur extraits d'axes ou de cotylédons.

Précisons les formes sous lesquelles se trouve le phosphore des extraits. Le phosphore soluble dans l'acide trichloracétique englobe principalement le phosphore phytinique et minéral. Les surnageants trichloracétiques ont donc été fractionnés afin de déterminer la proportion de phosphore phytinique qu'ils contiennent. Plusieurs modes d'isolement de la phytine ont été essayés et confrontés. Tout d'abord la précipitation par les ions Ba^{++} , Ca^{++} , Fe^{+++} à pH 8; la précipitation par les ions baryum ou calcium entraîne des complications pour la détermination du phosphore total du précipité du fait de formation, lors de la minéralisation, de sulfates insolubles nécessitant des filtrations. Toutefois les résultats recueillis ne s'écartent pas de ceux obtenus par formation de phytate ferrique. Mais la méthode la plus simple consiste, comme nous l'avons déjà dit, à évaluer la phytine par différence entre le phosphore total et le phosphore minéral des surnageants trichloracétiques; Cette approximation tenant pour négligeable les infimes quantités de substances phosphorées solubles

dans l'acide trichloracétique et qui ne sont ni minérales ni phytiniques. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 25. L'analyse des extraits cotylédonaire a été reprise sur des lots de farine autres que ceux des déterminations antérieures afin d'être menée simultanément et parallèlement à celle des extraits de farine d'axes.

TABLEAU 25

*Différentes formes de phosphore contenues dans les extraits protéiques.
Les teneurs en phosphore sont exprimées en pourcentage du poids sec de la prise d'essai.*

		P. total	soluble dans A.T.C.			insoluble dans ATC (protéique)	soluble ds les solutions saturées de sulfate d'am.	insoluble ds les solutions saturées de sulfate d'am. (protéique)
			total	phytinique	minéral			
farine	axes	0,80						
	cotylédons	0,22						
1 ^{er} extrait	axes	0,60	0,42	0,26	0,16	0,18	0,41	0,19
	cotylédons	0,19	0,16	0,13	0,03	0,03	0,15	0,04

Il n'y a pratiquement pas de différence dans la détermination du phosphore des protéines, que la précipitation de ces dernières ait lieu par l'acide trichloracétique ou par saturation avec le sulfate d'ammonium.

TABLEAU 26

Teneur des extraits protéiques en différentes formes de phosphore exprimées en pourcentage du phosphore extrait.

	P. total extrait	P soluble dans A.T.C.			P. protéique
		total	phytinique	minéral	
axes	100	70,0	43,3	26,7	30
cotylédons	100	84,2	68,4	15,8	15,8

Il n'est pas surprenant (tableau 26) de constater, chez l'axe, une proportion relativement plus forte de phosphore protéique (30% du phosphore extrait contre 15,8% chez les cotylédons).

Par contre, il est étonnant de constater que le taux de phytine présent dans le germe est loin d'être négligeable. Moins élevé que le taux cotylédonaire, il atteint cependant 43% du phosphore extrait et 33% du phosphore total de la farine.

Ainsi, la phytine, considérée comme substance de réserve, pourrait participer aux synthèses lors de la germination.

III. ETUDE DES FAMILLES PROTÉIQUES

1. Analyse des familles

A) Constitution

Les teneurs en azote, phosphore et glucides, exprimées en fonction du poids de protéines, ont été déterminées sur des prises d'essais des familles isolées, purifiées, cryodesséchées. Il a été tenu compte d'une teneur en humidité résiduelle éventuelle, établie par dessiccation à 110° de parties aliquotes. Les résultats figurent tableau 27.

TABLEAU 27

Teneur des albumines et globulines en azote, phosphore et glucides exprimée en pourcentage du poids sec de la protéine.

		Azote	Phosphore	Glucides
axe	G	15,2	0,9	7,5
	A	13,2	0,7	18,0
cotylédons	G	15,8	0,28	6,0
	A	15,3	0,07	8,5

D'une manière générale, les globulines, quelle que soit leur origine, sont plus riches en azote et en phosphore que les albumines. Par contre, elles sont moins riches en glucides.

La teneur en phosphore des protéines d'axe est singulièrement importante (0,7 à 0,9% environ) alors que chez les cotylédons les albumines en sont pratiquement dépourvues et les globulines n'en renferment que 0,28%.

Il est à noter qu'aucune famille protéique cotylédonaire ou embryonnaire n'est totalement dépourvue de sucres. La teneur minimum constatée atteint encore 6%. (Il n'est question que des familles globales car nous avons vu que les pseudo-globulines de cotylédons ne renferment que 2,5% de glucides).

Les albumines de l'axe sont particulièrement riches en glucides (18%). En conséquence leur taux d'azote est le plus faible de tous (13,2%). Cette forte teneur en glucides confère aux albumines de germe une remarquable stabilité que nous avons pu éprouver. Un extrait aqueux total cotylédonaire abandonné à 2° C devient rose, marron, presque noir en 8 à 10 jours, alors que l'extrait d'axes abandonné à côté dans les mêmes conditions reste clair. Toutefois, à température ambiante, les extraits aqueux de germe ou de cotylédons précipitent abondamment dès le deuxième jour, mais, au bout de 15 jours, leur couleur n'a pas changé. Les transformations dues au temps ne sont donc pas les mêmes à 2° et à 28°. La précipitation précoce empêcherait les transformations conduisant à des substances colorées.

B) *Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique.*

a) *Albumines.* Malgré les différences constatées précédemment dans la constitution des albumines d'axe et de cotylédons, les électrophorogrammes soulignent plutôt les similitudes (figure 15). Toutefois, les albumines de germe accusent une plus grande mobilité des fractions anodiques les plus mobiles et une proportion plus importante de fractions catodiques. De plus, la fraction, révélée chez les cotylédons, sous forme de spot arrondi rappelant l'apparence des albumines sériques, n'a pas son homologue chez les albumines d'axe.

De grandes analogies structurales doivent cependant exister entre albumines de chaque partie de la graine car la diffusion d'albumines d'axe contre l'immunoserum antialbumines de cotylédons révèle un nombre élevé d'arcs de précipitation, inférieur cependant à celui provoqué par la diffusion des albumines de cotylédons (fig. 16).

b) *Globulines.* Si les albumines de l'axe germinatif semblent plus complexes encore que celle de cotylédons, les globulines paraissent, en revanche, plus simples (fig. 17); la fraction anodique majeure est moins importante, les fractions catodiques moins nombreuses (on n'en décèle que 2); cependant, dans cette famille, comme dans les albumines, les identités structurales se manifestent entre globulines de l'axe et de cotylédons.

Tout d'abord, la fraction très mobile, révélée chez les globulines de cotylédons, existe également chez l'axe. En outre, des précipitations croisées montrent que la plupart des globulines de l'axe réagissent avec les anticorps provenant des mêmes globulines cotylédonaires.

2. *Fractionnement des familles*

Un fractionnement par chromatographie sur DEAE cellulose a été appliqué aux deux familles protéiques de l'axe suivant les mêmes principes que ceux observés pour le fractionnement des protéines cotylédonaires.

A) *Albumines*

L'élu­tion fut assurée par l'action combinée d'un gradient de force ionique et d'un gradient de pH. Ici la force ionique était celle du tampon phosphate

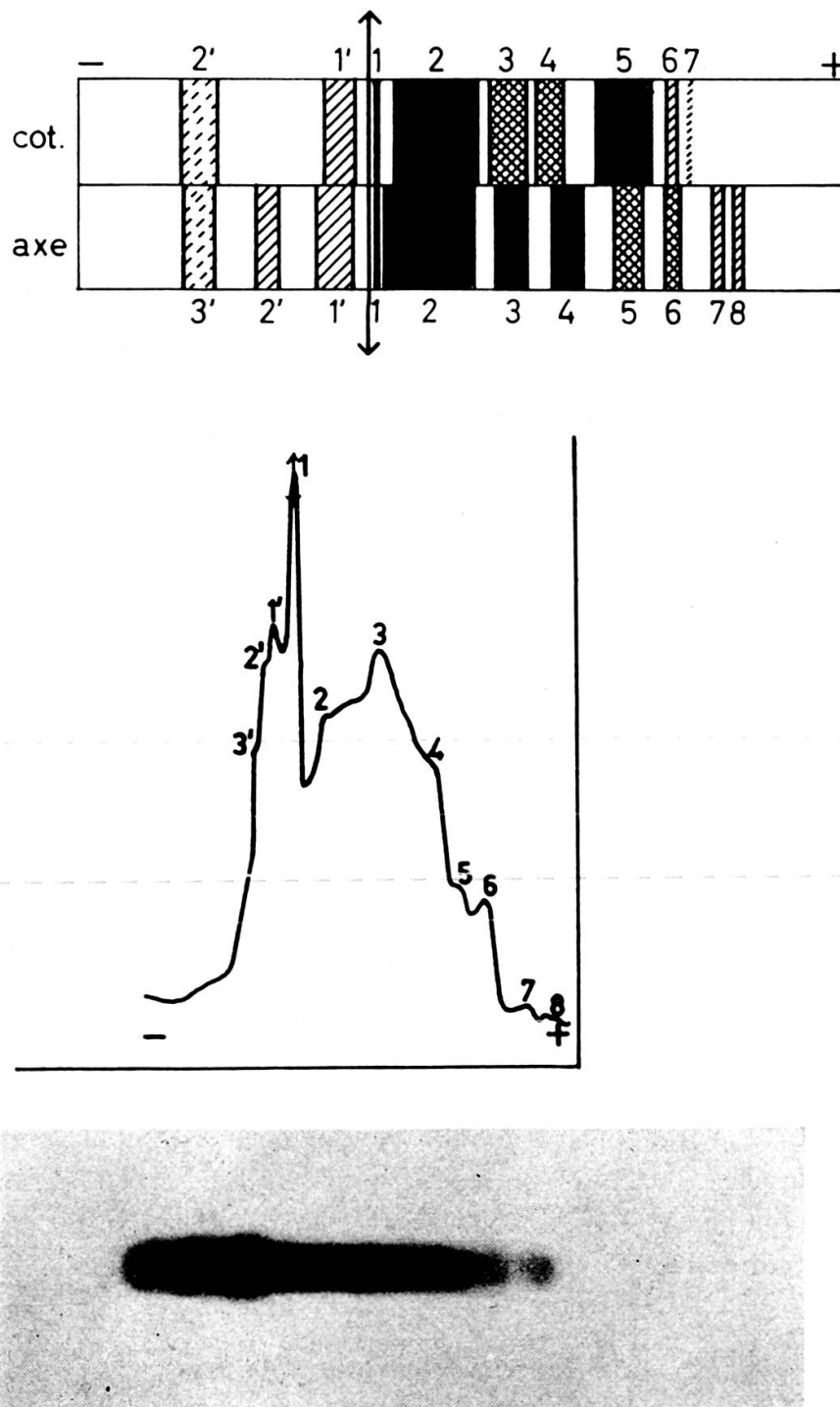


FIG. 15. a) — Electrophorégramme des albumines d'axe (photo) et courbe densitométrique.
 b) Schéma du diagramme fourni par une électrophorèse simultanée des albumines d'axe et de cotylédons.

et variait suivant une courbe à allure exponentielle de 0,005 M à 0,5 M; le pH passait, suivant le même rythme, de 8,4 à 3. Le chromatogramme obtenu (figure 18), permet de constater que 3 fractions principales ont été isolées dont une domine quantitativement très nettement les autres. Comme chez les cotylédons le gradient de pH mesuré

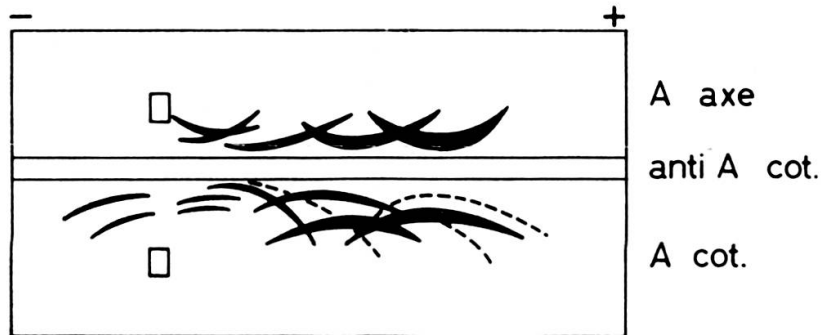


FIG. 16. — Electrophorèse d'albumines d'axe et de cotylédons diffusée contre l'immunsérum antialbumines de cotylédons.

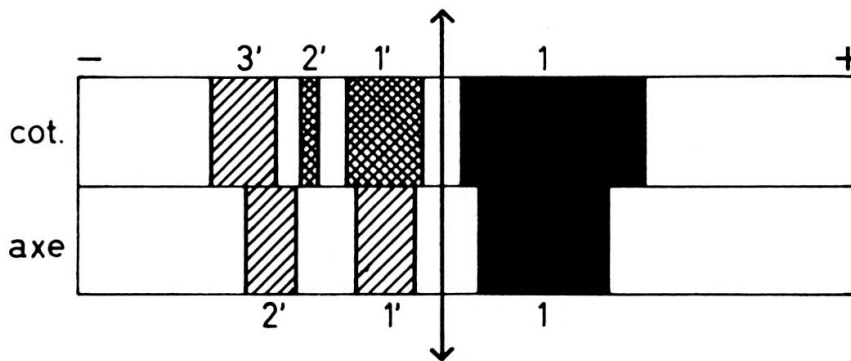


FIG. 17. — Electrophorégrammes comparés des globulines d'axe et de cotylédons.

à la sortie de la colonne s'éloigne de celui réalisé à l'entrée. Là encore il y a alcalinisation correspondant à la sortie des fractions les plus alcalines.

B) Globulines

L'allure du chromatogramme des globulines d'axe (figure 19) est différente de celle présentée par celui des globulines de cotylédons réalisé dans les mêmes conditions (figure 12). La fraction majeure est éluée à force ionique supérieure comme chez les cotylédons, les fractions éluées à faible force ionique sont catodiques, les fractions majeures éluées à force ionique supérieure sont anodiques.

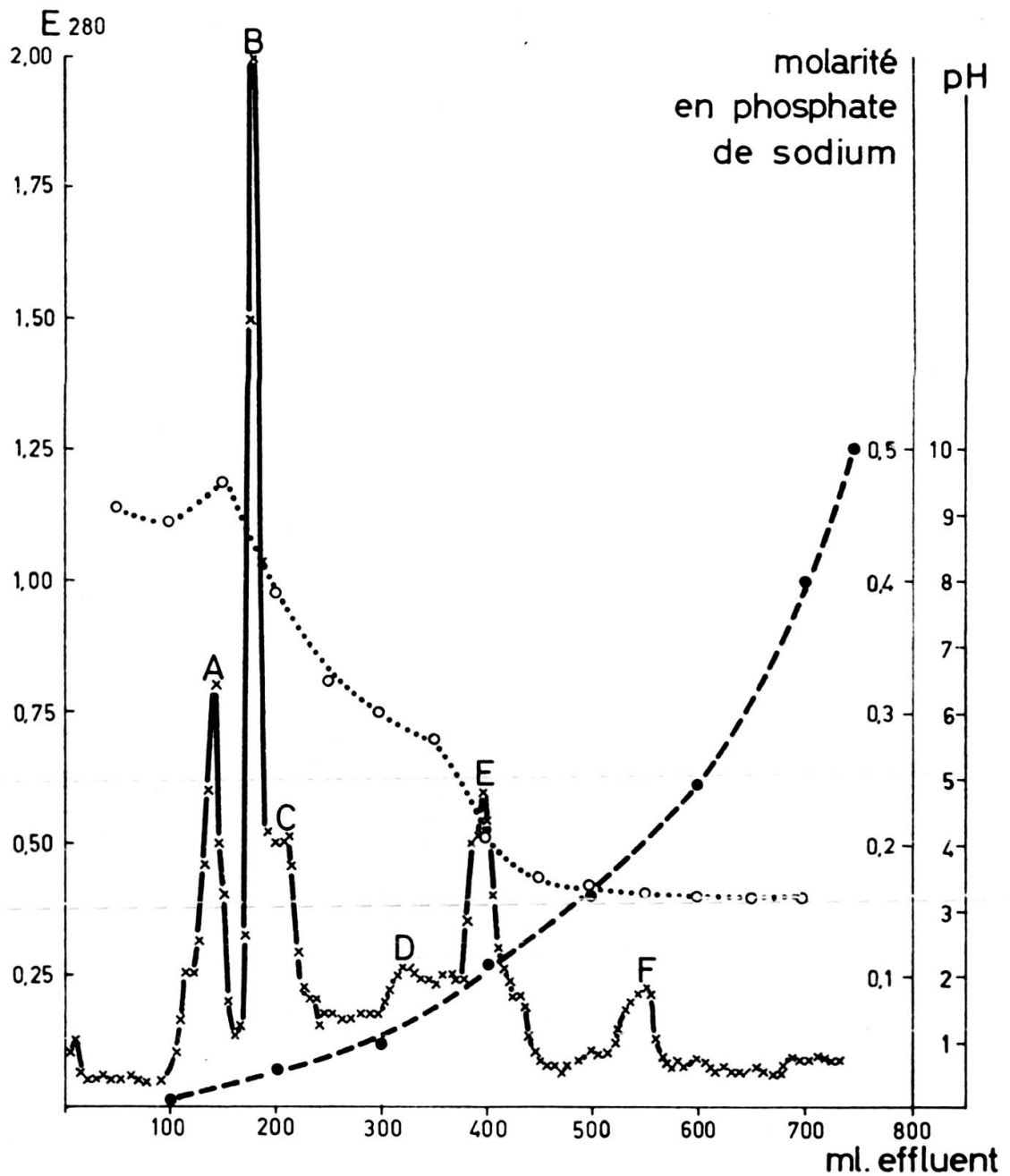


FIG. 18. — Chromatographie des albumines d'axe sur DEAE cellulose.
 Colonne: 1,5 cm × 30 cm. Poids de protéines appliqué: 320 mg.
 Taux de récupération: 79%. Effluent: 750 ml par fractions de 5 ml.
 Elution par gradient mixte de force ionique et de pH
 { phosphate 0,005 M pH 8,6
 à phosphate 0,5 M pH 3
 x ——— x Chromatogramme.
 ● ——— ● Gradient de force ionique.
 o o Gradient de pH.

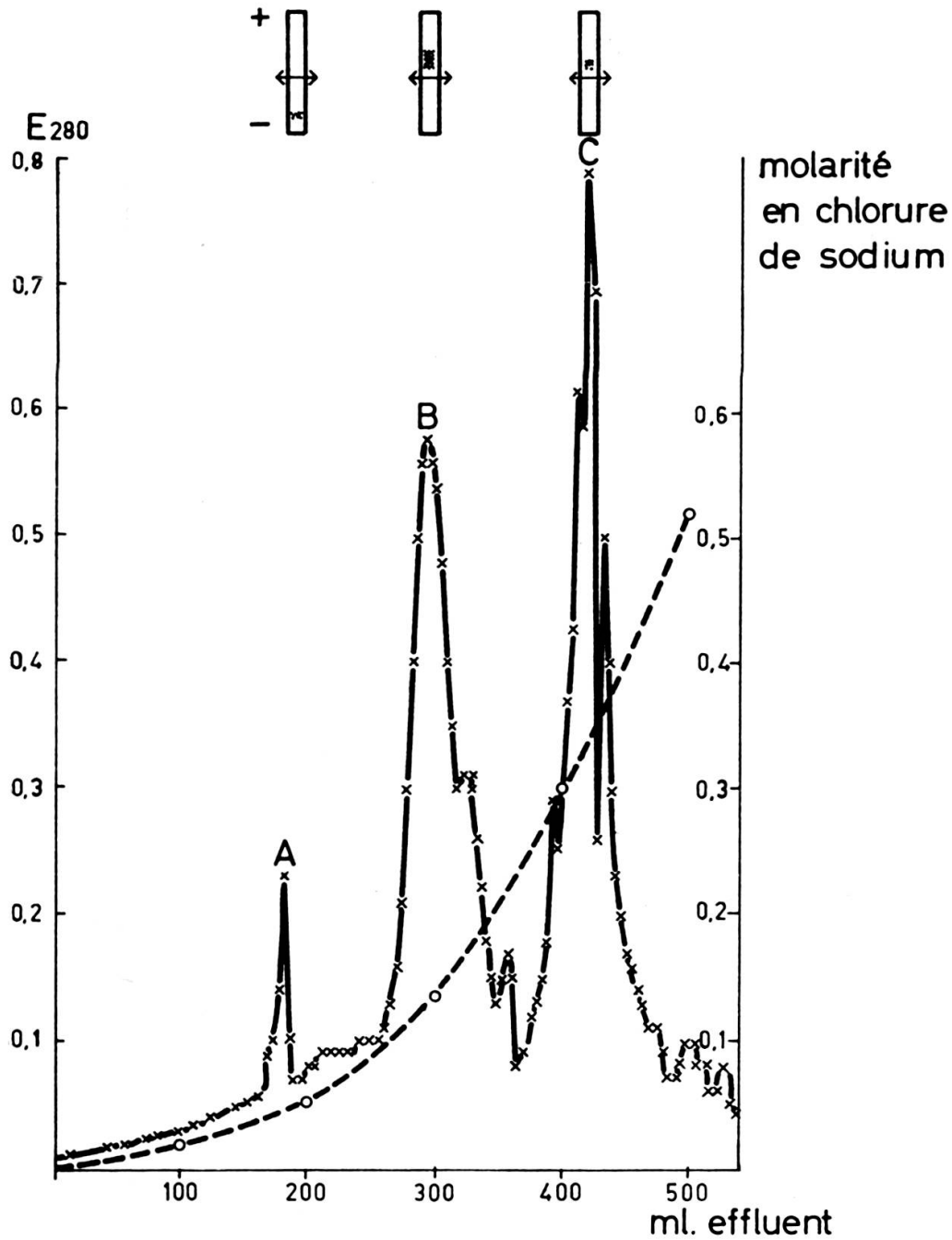


FIG. 19. — Chromatographie des globulines d'axe sur DEAE cellulose.
 Colonne: 1,5 cm × 30 cm. Poids de globuline appliqué: 300 mg.
 Taux de récupération: 75%. Effluent: 500 ml par fractions de 5 ml.
 Elution par gradient de concentration saline (NaCl 0 à 0,6 M).
 x ——— x Chromatogramme.
 o - - - - o Gradient de force ionique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

I. MISE AU POINT DES CONDITIONS D'EXTRACTION

L'étude des facteurs pouvant exercer une influence sur la solubilisation des protéines a conduit à déterminer les conditions optimales d'extraction et a permis, en outre, de révéler des fluctuations, dans les cotylédons de la graine quiescente, des caractères de solubilité des protéines.

- 1° La durée optimum de l'extraction est de 5 minutes à 2° C.
- 2° Pour une extraction exhaustive par l'eau, la meilleure dilution est la plus faible (des dilutions de 1,25 à 50 ont été testées), à condition d'effectuer au moins 5 extractions successives. Mais si la quantité des protéines extraites par l'eau est plus grande dans le cas d'une faible que d'une forte dilution, dans ce dernier cas, ce qui n'a pas été extrait l'est par les solutions salines. L'ensemble des protéines solubilisées par ces 2 solvants s'élève, dans l'un et l'autre cas, à 86 % de l'azote total.
- 3° L'influence de l'ordre d'action des 2 solvants: eau, solutions salines, se fait sentir surtout sur le premier extrait. Le rendement de celui-ci, dans le cas où le chlorure de sodium a été utilisé, est supérieur de 18 % à celui que donne le premier extrait aqueux (effectué sur farine fraîchement moulue en observant un taux de dilution de 15). Pour solubiliser la majorité des globulines et des albumines, il suffira d'effectuer 2 extractions successives par une solution de chlorure de sodium.
- 4° La force ionique optimum la plus faible est celle d'une solution de chlorure de sodium à 4 % ($\frac{I}{2}=0,68$). Le rendement de l'extraction est légèrement amélioré si une telle solution est tamponnée à pH 7.
- 5° Les protéines de farine fraîchement moulue sont beaucoup plus solubles que celles de farine conservée après mouture; l'effet, déjà sensible après 24 heures, atteint son maximum après 15 jours. C'est l'hydrosolubilité qui est particulièrement affectée puisqu'elle peut diminuer de presque 2/3. Mais la diminution de solubilité dans les solutions salines n'est pas, elle-même, négligeable et peut, dans les conditions les plus défavorables, atteindre 8 % des protéines normalement solubilisées, quantité qui ne peut plus alors être dissoute que par les solutions alcalines diluées.

Mais ces influences, exercées par l'état de la farine, ne sont pas constantes. Elles semblent soumises elles-mêmes à un curieux cycle interne de la graine, rythme endogène annuel conjugué avec un effet de sénescence.

6° Cependant, quel que soit l'état de la farine, une extraction exhaustive est réalisée en faisant intervenir successivement dans l'ordre ou bien les 3 solvants eau, chlorure de sodium à 4%, soude 0,1 N ou, plus simplement, chlorure de sodium puis soude. Dans les 2 cas, le taux d'azote solubilisé représente la presque totalité de l'azote de la farine puisqu'il s'élève à 98,5%. L'action de tous les facteurs dont nous avons précisé l'influence ne s'exerce que sur les taux relatifs solubilisés pour chaque solvant. Le taux d'azote dissous par l'eau agissant en premier solvant peut varier de 20 à 60%, les solutions salines succédant aux épuisements par l'eau permettent de compléter cette teneur à un total qui ne varie plus alors que de 81 à 87%. L'extraction saline rétablit totalement l'équilibre et amène la teneur en azote extrait à la proportion stable de 98,5%.

La complexité des extraits et la nature et les proportions des corps accompagnant les protéines en solution ont été précisées.

II. ANALYSE ET FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS COTYLÉDONAIRES

Sur 100 grammes de poids sec extrait 60 environ sont constitués de molécules protéiques non dialysables. Les petites molécules (40%) représentent en majorité des sucres dialysables (26% environ), le reste groupe principalement les amino acides et les sels minéraux.

La place des familles protéiques au sein de tous les corps azotés dissous a été précisée.

Une analyse de la constitution des extraits obtenus à partir de farines fraîchement moulues ou conservées après mouture, a permis de préciser que c'est la famille globulinique qui est responsable de l'importante baisse de solubilité des protéines dans l'eau consécutive au vieillissement de la farine. Toutefois, chacune des 3 familles subit cette influence dont l'effet se traduit par une légère baisse de solubilité dans les solvants aqueux ou salins.

Le mécanisme qui permettrait aux globulines d'être solubilisées par l'eau pure a été révélé par l'étude des substances phosphorées accompagnant les protéines en solution. Cette analyse a conduit à émettre l'hypothèse que les globulines formeraient avec la phytine un complexe hydrosoluble.

III. ANALYSE DES FAMILLES PROTÉIQUES COTYLÉDONAIRES

1° Les teneurs de chaque famille protéique en azote, phosphore et glucides furent précisées, révélant de sensibles différences. La plus frappante est l'opposition entre albumines, famille la plus riche en glucides, et pseudoglobulines, famille la plus

pauvre. Cependant, malgré ce contraste, la distinction de ces protéines en deux familles séparées est artificielle. En effet, l'isolement des pseudoglobulines se heurte à un défaut de reproductibilité. La recherche des causes responsables des irrégularités constatées a permis d'imputer au degré de dilution de l'extrait protéique les différences observées. Cependant, ce n'est pas sur la précipitation par les solutions demi-saturées en sulfate d'ammonium que la dilution exerce une influence, comme on pourrait le croire, mais c'est au cours de la première étape d'isolement de toutes les protéines que ce facteur intervient. En solution diluée, les pseudoglobulines précipitent au cours de la première dialyse, venant grossir artificiellement le précipité de globulines. Il n'est plus possible alors de les retrouver à l'étape normale de leur isolement. En solution concentrée, par contre, elles franchissent les étapes précédant leur isolement. C'est une dénaturation, favorisée par la dilution, qui les fait précipiter au cours d'une dialyse qui devrait les laisser en solution.

La première caractéristique des pseudoglobulines est donc une grande fragilité contrastant avec la stabilité des albumines. On peut rapprocher de cette opposition les teneurs en glucides qui sont également inverses. Mais les contrastes s'arrêtent là et l'on est surpris de constater une grande analogie des comportements électro et immunoélectrophorétiques. Ainsi on est conduit à penser que les albumines et les pseudoglobulines ne font qu'une famille. Chaque fraction de cette famille serait constituée de 2 entités dissociables, l'une stable riche en glucides, l'autre instable pauvre en glucides, les 2 entités ayant, par ailleurs, mêmes propriétés électrophorétiques et antigéniques. Les électrophorèses effectuées à pH 8,6 en gel d'agarose révèlent 9 fractions: 7 à mobilité anodique et 2 à mobilité catodique.

2° Le diagramme général des globulines révèle 3 fractions catodiques très distinctes, 1 fraction anodique majeure (hétérogène en immunoélectrophorèse) et une fraction anodique mineure très mobile, visible seulement après électrophorèses de très courtes durées.

Le fractionnement chimique des globulines comporte une précipitation isoélectrique suivie de précipitations fractionnées par saturation progressive à l'aide de sulfate d'ammonium. Selon que la solution protéique de départ est diluée (2%) ou concentrée (13%), la précipitation isoélectrique se produit à pH 4,28 ou à pH 5,45. Cette différence est à rapprocher des écarts que présente le pH de solubilité minimum à concentration protéique constante mais à forces ioniques différentes (5,1 pour $\frac{I}{2} = 0,3$ et 3,8 pour $\frac{I}{2} = 0,7$).

La saturation progressive par le sulfate d'ammonium permet d'obtenir un précipité dès 40% de saturation dans le cas de la solution protéique concentrée, par contre, avec une solution diluée, il faut aller jusqu'à 70% de saturation pour obtenir un début de précipitation. 2 fractions seulement, ainsi isolées, sont homogènes à l'électrophorèse.

La chromatographie sur DEAE cellulose a été appliquée aux familles globales albuminique et globulinique.

VI. ÉTUDE DES PROTÉINES EMBRYONNAIRES

L'axe est près de 4 fois plus riche en phosphore que les cotylédons bien qu'il ne soit que 2 fois plus riche en azote; en outre il contient une quantité non négligeable de lipides. Ces caractéristiques rendent compte de la différence de nature de ces deux organes. Par contre la teneur en glucides de l'axe est beaucoup plus faible que celle des cotylédons (40% contre 69%); l'amidon est responsable de cette différence, le germe n'en contenant que des traces. Si on ne considère que les glucides solubles, l'axe, par contre offre une teneur nettement supérieure (32% contre 14%).

L'examen des bilans d'extraction totale à l'aide, tout d'abord, des 3 solvants utilisés lors de la solubilisation des protéines cotylédonaires, puis avec l'intervention d'un quatrième solvant, l'alcool à 70°, a permis de révéler l'existence, propre au germe, d'une prolamine soluble non seulement dans l'alcool à 70° mais aussi dans l'eau pure (privée d'électrolytes). Le taux d'azote résiduel, non extractible par les moyens mis en œuvre, bien qu'encore relativement faible, est plus élevé pour le germe que pour les cotylédons (6% contre 1,5%).

Proportionnellement au taux d'azote extrait, le taux de phosphore des extraits de l'axe est 2 fois supérieur à celui des extraits de cotylédons, le taux de glucides accuse, lui-même, un léger avantage.

Ici, comme chez les cotylédons, la première étape d'isolement des protéines (précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation) permet d'éliminer la majorité de ces substances compagnes, à un degré moindre toutefois en ce qui concerne les matières phosphorées.

Une étude détaillée des formes sous lesquelles se trouve le phosphore dans les extraits a révélé une proportion de phosphore protéique près de 2 fois plus importante dans les extraits de l'axe que dans les extraits cotylédonaires (chez le germe 30% du phosphore total extrait contre 15,8% chez les cotylédons). Ceci n'est pas surprenant. On peut s'étonner davantage du taux relativement élevé de phytine qui, moins élevé que le taux cotylédonaire, atteint cependant 43% du phosphore extrait et 33% du phosphore total de la farine.

L'analyse des 2 familles embryonnaires a permis plusieurs constatations.

- Les globulines, qu'elles soient cotylédonaires ou embryonnaires, sont plus riches en azote et en phosphore mais moins riches en glucides que les albumines.
- Aucune famille cotylédonaire ou de l'axe n'est totalement dépourvue de glucides; la teneur minimum constatée atteint encore 6% (en ne considérant que les familles globales car les pseudoglobulines de cotylédons ne renferment que 2,5% de glucides). Ce sont les albumines de l'axe qui présentent le taux le plus élevé (18%), en conséquence leur taux d'azote est le plus faible de tous (13,2%).

- La teneur en phosphore des protéines de l'axe est singulièrement importante (0,7 à 0,9 %) alors que chez les cotylédons, les albumines en sont pratiquement dépourvues et les globulines n'en renferment que 0,28 %.
- La proportion des albumines par rapport aux globulines est plus élevée chez l'axe que chez les cotylédons.

Malgré les différences de constitution révélées entre protéines de germes et de cotylédons, les électrophorogrammes soulignent un certain nombre de similitudes. Toutefois les albumines de l'axe accusent une plus grande mobilité anodique et une plus forte proportion de fractions catodiques que celles des cotylédons, elles sont plus complexes. Par contre les globulines sont plus simples. La chromatographie sur cellulose anionique a permis de séparer, à partir des albumines comme des globulines, un grand nombre de fractions. Les chromatogrammes présentent des différences. Malgré ces particularités des protéines de chacune des deux parties de la graine qu'affirment les diagrammes chromatographiques ou électrophorétiques, une parenté de structure est révélée par croisements immunochimiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALTSCHUL, A. M., N. J. NECERE, A. A. WOODHAM et J. M. DECHARY (1964). — A new classification of seed proteins: application to the aleurins of *arachis hypogea*. *Nature*, 203, p. 502.
- L. Y. YATSU, R. L. ORY et E. M. ENGLEMAN, (1966). — Seed proteins. *Ann. rev. Plant. Physiol.* 17, p. 113.
- ANDERSON D. G. et A. G. MAC CALLA (1960a). — Sedimentation of cristallin globulin from cucurbit seed. *Canad. journ. biochem. and physiol.* 38, p. 275.
- A. G. MAC CALLA et D. R. MAC CALLA (1960b). — Electrophoretic properties of cristallin globulin from cucurbit seeds. *Canad. Journ. Biochem. and Physiol.* 38, p. 657.
- BARRE R. et J. LABAT (1962). — Etude du fractionnement des protéines sériques au moyen des sels phytiques et des sels de zinc. *Ann. Pharm. Fr.* 20, p. 597.
- BAUDET J. et J. MOSSE (1962). — Sur l'extractibilité des protéines de la farine par l'eau. *C. R. Ac. Sc. Paris.* 255, p. 2843.
- et J. MOSSE (1962). — Etude de l'extraction des protéines des graines I. Extraction par l'eau des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. Veg.* 4, p. 315)
- et J. MOSSE (1963). — Extraction des protéines des graines. III. Extraction par l'eau et les solutions salines des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. Veg.* 5, p. 303.
- J. MOSSE et Mlle. Th. MOURoux (1965). — Sur les causes du fractionnement des protéines de farine de blé solubles dans l'eau lors de leur extraction: interaction avec les composés phosphorés. *C.R.Ac.Sc. Paris* 260, p. 1007.
- BERTRAND D. (1963). — Techniques de dosages dans « Techniques de Laboratoire » J. LOISELEUR Ed. tome 1 fasc. 2 p. 983.
- BILS, R. F. et R. W. HOWELL (1963). — Biochemical and cytological changes in developing soybean cotyledons. *Crop. Science* 3, p. 304.
- BOURDILLON J. (1951). — A cristallin bean seed protein in combination with phytic acid. *J. Biol. Chem.* 189, p. 65.
- BRESSANI R. et R. CONDE (1961). — Changes in the chemical composition and in the distribution of Nitrogen of Maize at different stages of development. *Cereal chemistry*, 38, p. 76.
- BRIGGS P. R. et R. L. MANN (1950). — An electrophetic analysis of soybean protein. *Cereal chemistry*, 27, p. 243.

- BROHULT S. et E. SANDEGREN, (1965). — Seed proteins, dans « The Proteins »: 2A. p. 487-512. H. NEURATH et K. BAILEY Eds., *Ac. Press. Inc.* New York 661 pp.
- CHERRY J. H. (1963). — Proteins bodies, nucleic acids and enzymes of peanut cotyledons: changes on germination. p. 115 dans « Proceedings seed protein conference », New Orleans Louisianne
- DANIELSON, C. E. (1949). — Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. *Biochem. J.*, 44, p. 387.
- (1951). — The breakdown of the high molecular reserve protein of peas during germination. *Acta chem. Scand.* 5, p. 541.
- (1956). — Plant proteins. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 7, p. 215.
- DECHARY, J. M., K. F. TALLUTO, W. J. EVANS, W. B. CARNEY et A. M. ALTSCHUL (1961) — α conarachin. *Nature* 190, p. 1125.
- DIECKERT, J. W., J. E. SNOWDEN, A. T. MOORE, D. C. HEINZELMAN et A. M. ALTSCHUL (1962). — Composition of some subcellular fraction from seeds of *arachis hypogea*. *J. food Sci.* 27, p. 321.
- DJURTHOFT, R. (1961). — Salt soluble proteins of barley, 239 pp. Copenhagen Dansk videnskabs Forlag.
- DUVIK, D. N. (1955). — Cytoplasmic inclusions of the developing and mature maize endosperm. *Am. J. Bot.* 42, p. 717.
- (1961). — Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal chemistry* 38, p. 374.
- (1963). — Intracellular location of zein in Maize in « Proc. seed Protein Conference », New Orleans, 1963, p. 196.
- ELTON, G. A. H. et J. A. D. EWARD (1962a). — Starch gel electrophoresis of wheat proteins. *Nature* 187, p. 600
- et J. A. D. EWARD (1962b). — Starch gel electrophoresis of cereal proteins. *J. Sc. food Agric.* 13, p. 62.
- ENARI, T. M. et J. MIKOLA (1961). — Fractionation of barley albumin by chromatography on DEAE cellulose. Proc. 9th. cong. European Brewing conv. p. 62, Vienna. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- et J. MIKOLA (1962). — Die Fractionierung von Gerstenalbuminen durch Chromatographie über DEAE Zellulose. *Brauwissenschaft Dtsch.* 15, p. 100.
- E. PUPETTI et J. MIKOLA (1964). — Fractionation of the proteolytic enzymes of barley and malt. *Proc. Eur. Brew. Conv.* Brussels, 1963 p. 37.
- EVANS, W. J., W. B. CARNEZ, J. M. DECHARY et A. M. ALTSCHUL (1962). — Zone electrophoresis of conarachin, α conarachin and bovin serum albumin on polyacrylamid gel. *Arch. Biochem. Bioph. USA.* 96, p. 233.
- FOX, D. J., D. A. THURMAN et D. BOULTER (1963). — Electrophoresis of plant proteins in polyacrylamid gels. *Biochem. J.* 87, p. 29.
- D. A. THURMAN et D. BOULTER (1964). — Studies on the proteins of seeds of the Leguminosae 1. Albumins. *Phytochemistry* 3, p. 417.
- GHERKE, C. W., Y. H. OH et C. W. FREEARK (1964). — Carboxymethylcellulose column chromatographic fractionation and starch gel urea electrophoretic characterization of soft wheat proteins *Anal. Biochem.* 8, p. 434.
- GHETIE, V. et L. BUZILA (1962). — Crioproteine vegetale. *Stud. Cerc. Biochim. Rom.* 5 p. 65.
- GIJSEL, A. VAN, G. PREAUX et R. LONTIE (1961). — Fractionation of barley albumins by chromatography on carboxymethylcellulose columns. *Arch. Int. Physiol. Bioch.* 59, p. 665.
- GRABAR, P. et P. BURTIN (1960). — Analyse immunoélectrophorétique; ses applications aux liquides biologiques humains. MASSON Edt. Paris.
- N. BENHAMOU et J. DAUSSANT (1962). — Etudes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques de quelques protéines de l'orge et du blé. *Arch. Biochem. Biophys.* supplément 1, p. 187.
- (1963). — Analyse immunoélectrophorétique, dans « Techniques de Laboratoires » J. LOISELEUR Edt. tome 1 fascicule 2 p. 1390 publié par MASSON.
- et J. DAUSSANT (1964). — Study of barley and malt amylases by immunochemical methods. *Cereal chem. USA* 41, p. 523.
- GRAHAM, J. S. D., A. C. JENNINGS, R. K. MORTON, B. A. PALD et J. K. RAISON (1962). — Protein bodies and protein synthesis in developing wheat endosperm. *Nature*, 196, p. 967.

- GRAHAM, J. K. MORTON et J. K. RAISON (1963). — Isolation and characterisation of protein bodies from developing wheat endosperm. *Austr. J. Biol. Sci.* 16, p. 375.
- HAUROWITZ, F. (1963). — The chemistry and fonction of proteins. *Ac. Press.* New York.
- HELLOT, R. et M. MACHEBOEUF (1947). — Les protéines de la graine d'arachide (*Arachis hypogea*). VI. Identification des impuretés phosphorées. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 29, p. 817.
- JOHNSON, P. et E. M. SHOOTER (1950a). — The globulins of the groundnut. I. Arachin's study as a dissociation system. *Biochem. Biophys. Acta* 5, p. 361.
- E. M. SHOOTER et E. K. RIDEAL (1950b). — The globulins of the groundnut. II. Electrophoretic examination of arachin's system *Biochem. Biophys. Acta* 5, 376.
- F. J. JOUBERT et E. M. SHOOTER (1950c). — Reversible dissociation of arachin. *Nature G.B.* 165, p. 595.
- JOUBERT, F. J. (1955). — Lupin seed proteins. I. A physico-chemical study of the proteins from blue lupin seed (*lupinus angustifolius*). *Biochem. Biophys. Acta* 16, p. 370.
- JOUNG, E. G. (1963). — Occurence, classification, preparation and analysis of proteins; dans « Comprehensive Biochemistry »: vol. 7: Proteins part 1 p. 6, M. H. FLORKIN et E. H. STOTZ Edts. Elsevier publish.
- KLOZ, J., V. TURKOVA et E. KLOZOVA (1959). — Serological investigation of taxonomic specificity of proteins in various plant organs in some taxons of the family Viciaceae. *Biol. Plantarum* 2, p. 126.
- V. TURKOVA et E. KLOZOVA (1966b). — Proteins found during maturation and germination of seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Biol. Plantarum Tcheosl.* 8, p. 164.
- KOCH, F. C. et T. L. MC MEEKIN (1924). — A new direct nesslerisation microkjeldahl method and a modification of the Nessler Folin Reagent for ammonia. *Journ. amer. chem. soc.* 46, 2066.
- KRETOVITCH, V. L., A. A. BUNDEL, S. S. MELIK-SARKISYAN et K. M. STEPANOVITCH (1954). — (en Russe) Sur les soi-disant protéides de réserve des graines. *Biokhimiya URSS* 19, p. 208.
- LANDRY, J., M. SALLANTIN, J. BAUDET et J. MOSSE (1965). — Extraction des protéines de graines, VI. Extraction exhaustive et fractionnement des protéines de la farine de blé. Electrophorèse en gel d'amidon des fractions séparées. *Ann. Physiol. Veg.* 7, p. 283.
- (1965). — Fractionnement de la zéine par chromatographie sur Sephadex. *C. R. Ac. Sc. Paris* 261, p. 2775.
- et M. SALLANTIN (1966). — Electrophorèse de la zéine sur gel d'amidon. *C. R. Ac. Sc. Paris* 263, p. 156.
- MASSEYEFF, R. (1959). — Nouveau procédé de microélectrophorèse en gel de gelose. *Bull. Mem. Ecol. Nat. Med. Dakar* 7, p. 248.
- MIÈGE, M. N. (1968). — Constitution chimique des plantes et systématique; signification taxonomique des protéines et acides nucléiques. *Candollea* 23, 229.
- MONDOVI, B., P. FASELLA, C. TURANO, A. M. WOLF, A. S. SANTORO, P. TURIN, P. BOSSA et D. CAVALINI (1964). — Studies on the extraction and preliminary characterisation of cotton seed proteins: *Ital. J. Biochem.* 13, p. 413.
- MOSSE, J. et J. BAUDET (1963). — Sur les conditions d'extraction aqueuse des protéines de la farine solubles dans l'eau *C. R. Ac. Sc. Paris* 257 p. 537.
- et J. BAUDET (1963). — Extraction des protéines de graines. II. Influence des facteurs intervenant dans l'extraction des protéines de la farine solubles dans l'eau. *Ann. Physiol. vég.* 5, p. 151.
- et J. BAUDET (1964). — Extraction des protéines des graines. IV. Extraction exhaustive et fractionnement des protéines de la farine de blé. Composition en acides aminés des 17 fractions séparées. *Ann. Physiol. vég.* 6, p. 283.
- J. BAUDET et P. GUYON (1964). — Mise au point d'un procédé d'extraction continu des protéines d'une farine de graine. Application à la farine de blé. *C. R. Ac. Sc. Paris* 258 p. 368.
- et J. BAUDET (1965). — Extraction exhaustive et fractionnement des protéines de la farine de blé. Composition en acides aminés des 17 fractions séparées. *C. R. Ac. Sc. Paris*, 260 p. 7037.
- MOREAUX, (Mlle. TH.) (1965). — Extraction des protéines des graines. — V. Les composés phosphorés de la farine de blé, facteurs du fractionnement protéique au cours de l'épuisement de la farine par l'eau. *Ann. Physiol. vég.* 7, p. 5.

- MOREAUX, J. BAUDET et J. MOSSE (1966). — Fractionnement des albumines du maïs par chromatographie sur Sephadex. *C. R. Ac. Sc. Paris* 263, p. 1710.
- NAGEL, R. H., H. C. BECKER et R. T. MILNER (1938). — Some physiological factors affecting the dispersion of soybean in water. *Cereal chemistry* 15, p. 463.
- NARAYANAMURTI, D. et C. RAMASWAMI (1930) CLXXX. Vegetable proteins. I. The proteins of *Dolichos Lablab*. *Biochem. J.* 24, p. 1650.
- OH, Y. H. et C. W. GHERKE (1965). — Stepwise elution chromatographic isolation on C. M. cellulose of the salt soluble proteins from wheat albumins and globulins. *Anal. Biochem.* 10, p. 409.
- OSBORNE, T. B. (1924). — The vegetable proteins, 2nd Ed. Longmans, Green and Co., London, New York, 154 pp.
- PACE J. (1955). — Seed proteins p. 69-105 dans « Moderne Methoden der Pflanzenanalyse » K. PAECH et M. V. TRACEY Eds. Springer Verlag. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- PERLES, R. (1962). — Contribution à l'étude biochimique des graines de sorgho. Thèse Dr Pharmacie. Paris. 1962 175 pp.
- Proceedings seed protein Conference. New Orleans. (1963). Southern utilization Res. Development Div. U.S. Dept. Agr. New Orleans 292 pp.
- QUENSEL, O. (1942). — Untersuchungen über die Gersten Globuline, Diss. 97 pp. Almqvist un Wiksell, Uppsalla.
- (1942). — Investigation on the globulins of barley. Ph D thesis. Univ. Uppsalla Sweden.
- RONDELET, J. et R. LONTIE (1953). — Le fractionnement continu des albumines et globulines de l'orge. *Eur. Brew. Conv. Proc. IV^e Congress* p. 22.
- et R. LONTIE (1955). — Nouvelles méthodes d'extraction et de fractionnement des protéines de l'orge. *Eur. Brew. Conv. Congress*, p. 90.
- SAJANOVA, V. V. (1965). — en russe: Changement de la concentration des protéines en cours de maturation des graines de diverses espèces de *Phaseolus*. *Nauch. Dokl. vyssh. Shk. biol. Nauki SSR.*, 3, p. 140.
- SMITH, A. H., E. N. SCHUBERT et P. A. BELTEN (1955). — Soybean protein fractions and their electrophoretic patterns. *J. amer. oil chemists Soc.*, 32, p. 274.
- et J. J. RACKIS (1957). — Phytin elimination in soybean protein isolation. *J. am. chem. soc.*, 79, p. 663.
- STAUB, A. M. (1963). — Extraction, identification et dosage des glucides dans les extraits d'organes et les corps bactériens dans Techniques de Laboratoires, 1, fasc. 2, p. 1308, J. LOISELEUR, 3^e édit., Paris, Masson.
- STEWARD, F. C. et J. F. THOMPSON (1954). — Proteins and protein metabolism in plants. dans The Proteins, 2A, NEURATH & BAILEY Eds., *Acad. Press Inc.*, N.Y., 661 p., 1954.
- R. F. LYNDON et J. T. BARBER (1965). — Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins: a study on pea seedlings in relation to development. *Am. J. Bot.*, 52, p. 155.
- THOMBS, H. P. (1965). — An electrophoretic investigation of groundnut proteins the structure of arachins A and B *Biochem. J.*, 96, p. 119.
- URION, E., G. LEJEUNE et V. GOLOVTCHEKNO (1944a). — La discrimination des constituants azotés de l'orge. 1. Mémoire. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 26, p. 221.
- G. LEJEUNE et V. GOLOVTCHEKNO (1944b). — La discrimination des constituants azotés de l'orge. 2. Mémoire. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 26, p. 303.
- WEINTRAUB, T. A. et A. D. SHUTOV (1964). — The chromatography of Vetch seed proteins on DEAE cellulose (res. Angl.). *Biokhimiya* 29, p. 865.
- WOYCHIK, J. H., R. J. DIMLER et F. R. SENTI (1960). — Chromatographic fractionation of wheat gluten on carboxymethylcellulose columns. *Arch. Biochem. Bioph.* 91, p. 235.
- ZIGMAN, S. et S. LERMANS (1964). — A cold precipitable protein in the lens. *Nature*, 203, p. 662.

