

ÉTUDE DES CONDITIONS DE
PRÉCIPITATION ET DE CRISTALLISATION DE PROTÉINES
MUSCULAIRES DU GROUPE MYOGÈNE

par

A. DISTÈCHE*

*Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences,
Université de Liège (Belgique)*

On sait, depuis les travaux de COHN¹, que la solubilité (S) d'une protéine est une fonction du p_H et de la force ionique (μ) du milieu, de la forme

$$S = f(\mu, p_H) = e^\beta - Ks\mu$$

où β est une fonction compliquée du p_H et Ks une constante spécifique. Cette propriété a été beaucoup utilisée pour la séparation de mélanges de protéines. La plupart de ces recherches ont été effectuées à p_H constant ($\beta = \text{constante}$). La fonction $f(\mu, p_H)$ prend alors une forme simple et la variation de la concentration protéinique en fonction de μ , pour un mélange, se fait suivant une courbe composée de plusieurs segments logarithmiques. Quand les protéines étudiées ont des solubilités suffisamment différentes, chaque segment définit la zone de précipitation de chaque constituant au p_H choisi. Cette méthode d'analyse a été utilisée par de nombreux auteurs et elle a été particulièrement développée par DERRIEN, ROCHE ET MANDEL^{2, 3, 4, 5, 6}.

Ces mesures ne couvrent toutefois qu'une partie de la variation de S , car les courbes ne peuvent être déterminées avec précision dans la zone des points isoélectriques, où une très faible variation du p_H modifie fortement la solubilité. D'autre part, leur interprétation n'est, en général, pas simple: dans le cas de protéines de solubilités voisines, la sommation des segments logarithmiques masque la fin des précipitations et ne permet ni de déterminer avec précision les zones de coprécipitation, ni d'établir, avec certitude, le nombre de constituants présents**.

Nous croyons qu'il est possible d'apporter une solution plus générale à ce problème en étudiant la fonction $S = f(\mu, p_H)$ à p_H variable et à force ionique constante (et pour différentes valeurs de la force ionique) dans la zone des points isoélectriques des protéines.

On sait que la solubilité d'une protéine est minimum au point isoélectrique***. Pour une solution de concentration donnée en protéine, le minimum est observable dès que la force ionique du milieu atteint une valeur telle que la concentration en protéine iso-

* Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

** Dans certains cas, il est possible de remédier partiellement à ces défauts quand on peut évaluer la concentration d'une des protéines du mélange par son activité enzymatique. La comparaison de la courbe de précipitation ainsi obtenue avec celle tracée au moyen des mesures d'N protéinique, permet de déceler les zones de coprécipitation (FALCONER ET TAYLOR⁷). Ces cas sont malheureusement encore rares.

*** Il ne sera pas fait ici de distinction entre point isoélectrique et point isionique. Voir à ce sujet: C. L. SCHMIDT, *Chemistry of amino-acids and proteins*, C. Thomas Pub., 1945, p. 940.

Bibliographie p. 276.

électrique devient supérieure à la solubilité de la protéine, dans cet état et dans ces conditions. Quand la force ionique devient suffisamment élevée, la solubilité de la protéine tend vers zéro, et le minimum disparaît. Traçons, pour un mélange de protéines, une série de courbes de solubilité en fonction du p_H , à force ionique constante, chaque courbe étant définie par une valeur déterminée de la concentration saline. Ces courbes vont présenter un certain nombre de minima et l'examen de l'évolution de chacun d'entre eux, lorsque varie la force ionique, nous permettra de définir les limites de "salting-out" de chaque protéine, à son point isoélectrique. On peut s'attendre à ce que les fins de précipitation soient difficiles à préciser, à cause de l'étalement progressif des minima, dès que la solubilité au point isoélectrique devient nulle. Par contre, au point de vue analytique, la méthode que nous décrivons sera nettement meilleure que les courbes à p_H constant: en effet, *seules les protéines ayant même point isoélectrique et même limites de précipitation isoélectrique passeront inaperçues*. Si les points isoélectriques sont voisins et si l'évolution des minima correspondants en fonction de μ est la même, les protéines responsables ne pourront être séparées par "salting-out": elles coprécipiteront à tous les p_H . Si les points isoélectriques sont distants, il sera possible de séparer deux protéines ayant les mêmes limites de précipitation à leur p.i., en effectuant des précipitations à des p_H judicieusement choisies (aux p.i. par exemple). Si les p.i. sont trop éloignés les uns des autres, la méthode ne pourra s'appliquer qu'avec précaution, à cause du danger de dénaturation.

On peut également prévoir que la détermination des points isoélectriques et des limites de solubilité permettront de choisir aisément les conditions les plus favorables à la cristallisation de certaines protéines; en effet, dans une solution saturée en différentes protéines, celle qui aura le plus tendance à cristalliser sera celle qui sera à son point isoélectrique.

En résumé, un diagramme de courbes de solubilité à p_H variable et force ionique constante, permet de dénombrer les protéines d'un mélange, de mesurer leur point isoélectrique, de déterminer leur séparabilité par "salting-out" et les conditions les meilleures à leur cristallisation éventuelle.

A notre connaissance, une étude systématique de ce genre n'a pas encore été faite. Les travaux relatifs à l'influence du p_H sur la solubilité des protéines à différentes forces ioniques sont assez peu nombreux. COHN ET HENDRY⁸, SØRENSEN ET SLADEK⁹, LINDERSTRÖM-LANG ET KODAMA^{10, 11}, SØRENSEN ET SØRENSEN^{12, 13}, SØRENSEN ET HÖYRUP¹⁴, GREEN^{15, 16} et GRÖNWALL¹⁷ ont montré l'existence d'un ou plusieurs minima de solubilité pour la caséine, la carboxyhémoglobine, l'albumine de l'œuf, l'hémoglobine, la lactoglobuline et ont étudié le déplacement des points isoélectriques de ces différentes protéines en fonction de la force ionique. D'autre part, la précipitation isoélectrique a été utilisée pour préparer certaines globulines du sérum par GREEN¹⁵, HEWITT¹⁸, BIERRY¹⁹ et d'autres; mais l'étude détaillée de l'influence de la force ionique n'a pas été faite. MACHEBOEUF²⁰ et SANDOR, BONNEFOI ET PÉREZ^{21, 22} ont étudié l'influence du p_H sur la précipitation des protéines sériques à de fortes concentrations salines et ont noté plusieurs accidents dans les courbes. Le nombre de mesures était nettement insuffisant et les auteurs n'ont pas utilisé leurs résultats pour suivre, de façon systématique, le fractionnement du sérum.

Nous avons effectué, au moyen de la méthode dont nous venons d'indiquer le principe, une étude systématique d'extraits musculaires de protéines du groupe du myogène.

TECHNIQUE

L'extrait musculaire est préparé selon la méthode utilisée par BARANOWSKI²³ pour le myogène A et est exactement saturé à 50% en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 22° C. Les précipitations se font par addition, volume à volume, à 22° C, de solutions précipitantes contenant des quantités égales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et un mélange de Na_2HPO_4 et KH_2PO_4 . *On s'arrange pour que l'incrément de force ionique dû aux phosphates soit identique dans chaque solution, quel que soit le p_{H} choisi.*

Les précipités sont centrifugés et la concentration en protéines des solutions surageantes est évaluée au réfractomètre de Pulfrich, par une mesure de l'incrément d'indice de réfraction dû aux protéines par rapport à une solution de concentration saline identique. Les p_{H} sont mesurés à l'électrode de verre, à 22° C.

1. *Préparation des extraits musculaires.* La méthode de BARANOWSKI²³ consiste à isoler de l'extrait aqueux de muscle de lapin une fraction précipitant entre 45% et 65% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 4° C. Cette fraction, redissoute, est portée à 52° C pendant 20 minutes. Les protéines restantes sont reprécipitées par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et dissoutes dans le minimum d'eau. On dialyse les protéines ainsi obtenues contre de l'eau distillée à 1° C, jusqu'à disparition du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Le précipité qui se forme est centrifugé et on amène la solution claire exactement à la demi-saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 22° C. Pratiquement, ceci s'effectue en ballon jaugé, en ajoutant à un volume donné de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturé à 22° C, la quantité de solution protéinique nécessaire pour doubler ce volume. On filtre le léger trouble et on obtient un liquide limpide jaune rouge, que l'on conserve en glacière. C'est notre extrait musculaire type.

2. *Précipitation.* Les solutions précipitantes, de force ionique constante et de p_{H} variable, sont préparées de la façon suivante.

Lorsque le p_{H} doit être compris entre 6.60 et 5.50, le sulfate ammonique est pesé et introduit dans un ballon jaugé de 25 ml. On y ajoute ensuite des volumes mesurés d'une solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M et d'une solution de KH_2PO_4 0.1 M dans les rapports suivants:

$$\begin{array}{llllllll} \text{ml de } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} & 0.1 \text{ M} & 10 & 9.66 & 9.33 & \dots & 6.33 & \text{soit } Z_1 \\ \text{ml de } \text{KH}_2\text{PO}_4 & 0.1 \text{ M} & & 0 & 1 & 2 & \dots & 11 & \text{soit } Z_2 \end{array}$$

Ces valeurs satisfont la relation $\frac{3Z_1}{250} + \frac{Z_2}{250} = 0.12$ qui donne l'incrément de force ionique résultant. La valeur 0.12 est arbitraire, mais convient dans le cas qui nous occupe.

Lorsque le p_{H} varie entre 6.75 et 6.60, les solutions sont préparées de la même façon, mais nous avons doublé l'incrément de force ionique correspondant au tampon. La quantité de sulfate ammonique ajoutée est modifiée en conséquence. Le phosphate monopotassique a été remplacé par le sulfate de potassium qui introduit des ions K^+ et assure ainsi une identité ionique complète entre les deux séries de solution. Le schéma utilisé devient donc:

$$\begin{array}{llllllll} \text{ml de } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} & 0.2 \text{ M} & 5 & 5.5 & 6 & \dots & 8 \\ \text{ml de } \text{K}_2\text{SO}_4 & 0.2 \text{ M} & & 5 & 4.5 & 4 & \dots & 2 \end{array}$$

La précipitation des protéines s'effectue en introduisant 3 ml de solution de l'extrait musculaire et 3 ml de solution précipitante dans une série de tubes à centrifuger au moyen d'une pipette calibrée. Ces opérations et les suivantes se font de façon aussi identique que possible. La température ambiante est maintenue à 22° C. Les tubes bouchés sont agités par balancement dans un thermostat à 22° C, pendant 10 minutes. On centrifuge pendant 7 minutes à 6000 tours/min et on préleve le liquide surageant pour les mesures d'indice et de p_{H} .

Les solutions de comparaison pour ces mesures d'indice sont préparées exactement de la même façon, en remplaçant l'extrait musculaire par une solution demi-saturée en sulfate ammonique à 22° C.

3. *Mesures d'indice et de p_{H} .* Les mesures d'indice se font à 22° C, à l'aide d'un réfractomètre de Pulfrich à prisme à double compartiment. Des couples thermoélectriques, plongeant dans les liquides, permettent de faire la mesure à égalité parfaite de température.

Malgré la complexité de l'extrait type, l'incrément d'indice dû aux protéines varie linéairement avec la concentration en azote protidique. Nous avons également vérifié qu'il était indépendant du p_{H} .

La Fig. 1 représente la courbe de dilution de l'extrait par une solution saturée²⁴ à 50% en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

La Fig. 2 montre que l'incrément est indépendant du p_{H} entre 5.50 et 6.70.

Il est possible, au moyen de cette méthode de mesurer très rapidement des variations relatives de concentrations en protéines avec une précision de 0.5%.

Les mesures de p_H sont faites à l'électrode de verre au moyen de l'electromètre à lampes DUBUISSON-DEBOT²⁴, qui permet d'atteindre une précision de 0.005 unité p_H . Toutefois, la forte concentration en $(NH_4)_2SO_4$ entraîne l'apparition d'un potentiel de diffusion important. Nous avons obtenu des résultats reproductibles et stables, en employant des ponts de jonction sans agar. Le potentiel de diffusion mesuré par la méthode de BJERRUM²⁵ est d'environ 6 mv. Il n'en a pas été tenu compte dans le calcul des p_H .

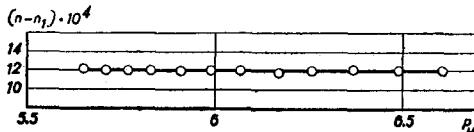
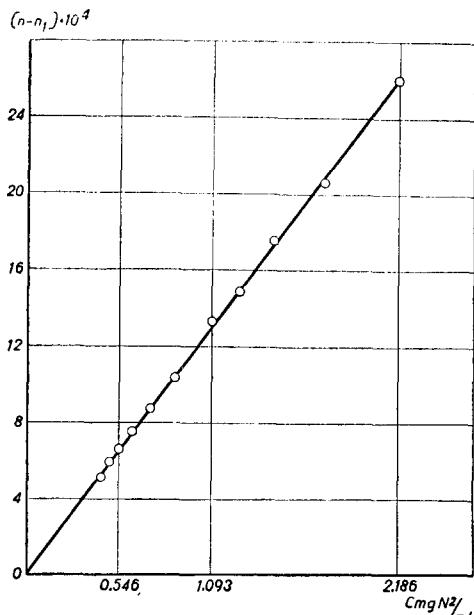


Fig. 2. Variation de l'incrément d'indice de l'extrait musculaire en fonction du p_H

Fig. 1. Variation de l'incrément d'indice de l'extrait musculaire en fonction de la dilution par une solution de sulfate ammonique à 50% de saturation

RÉSULTATS

A. COURBES DE SOLUBILITÉ, A p_H VARIABLE ET A FORCE IONIQUE CONSTANTE, D'UN EXTRAIT MUSCULAIRE

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus en adoptant les techniques exposées plus haut, est représenté dans le diagramme de la Fig. 3. En ordonnée, nous avons porté la concentration en protéines en % de la teneur totale et, en abscisse, le p_H . Les concentrations finales en $(NH_4)_2SO_4$ ont été calculées en moles/l, en admettant l'additivité des volumes, et la valeur expérimentale 2.008 M pour une solution saturée à 50% en $(NH_4)_2SO_4$ à 22° C.

Les premiers résultats que nous avons obtenus se situent entre les p_H 6.60 et 5.50. La partie plus alcaline des six premières courbes a été construite ultérieurement et des mesures ont été refaites chaque fois comme contrôle jusqu'à p_H 6.30.

Les courbes sont facilement reproductibles. Dans l'ensemble, on peut suivre aisément l'évolution des divers minima. Le tracé des courbes, dans les cas douteux, est en général légitimé par la forme et la position des minima des courbes immédiatement voisines. Dans la partie alcaline des courbes I à VII, tous les points expérimentaux n'ont pas été indiqués, afin de ne pas surcharger le diagramme.

En tout, il est possible de déceler, dans les zones de p_H et de concentrations salines étudiées, huit minima correspondant à autant de protéines de points isoélectriques: 5.59 - 5.71 - 5.83 - 5.95 - 6.00 - 6.07 - 6.52 - 6.70. L'examen de l'évolution de ces divers minima, au fur et à mesure que la force ionique augmente, permet de distinguer deux groupes importants formés par les protéines précipitant avant 2,341 M et celles précipitant à une concentration supérieure. Dans chacun de ces deux groupes, les valeurs limites de la force ionique entre lesquelles il y a précipitation isoélectrique

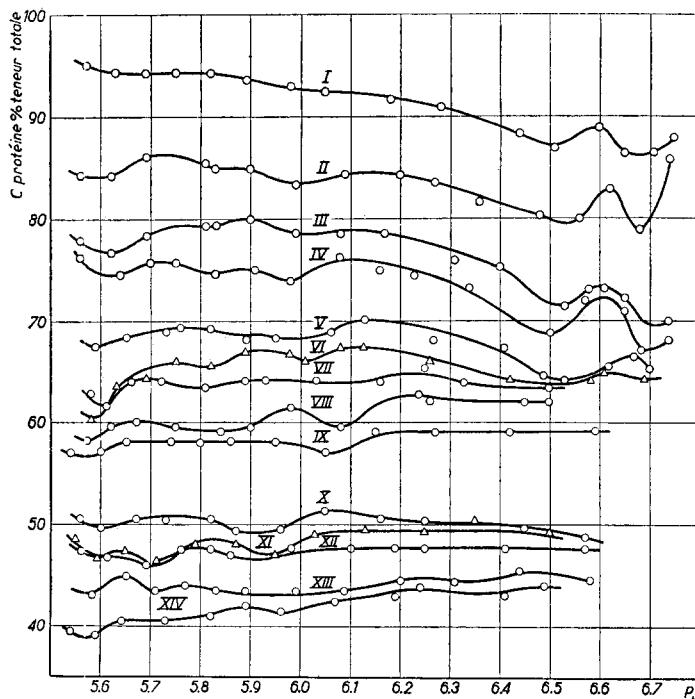


Fig. 3. Courbes de précipitation, à p_H variable et à force ionique constante pour les valeurs suivantes de la concentration en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (en moles par litre): I: 2,192; II: 2,225; III: 2,258; IV: 2,275; V: 2,308; VI: 2,325; VII: 2,341; VIII: 2,375; IX: 2,401; X: 2,441; XI: 2,475; XII: 2,508; XIII: 2,575; XIV: 2,641

sont pratiquement les mêmes pour chaque protéine. Leurs points isoélectriques étant très proches, il y aura coprécipitation dans une zone de p_H importante et l'on ne peut pas espérer effectuer une séparation efficace par simple "salting-out". Ceci nous permet d'attirer l'attention sur le fait que très souvent on attribue l'inhomogénéité de certaines fractions de protéines, recueillies par précipitation saline, à des phénomènes d'entraînement mécanique ou d'adsorption sans s'assurer s'il ne s'agit pas de coprécipitation réelle, due à l'existence de caractères physico-chimiques très semblables.

Le diagramme de solubilité, à p_H variable et μ constant, dans le cas de protéines de propriétés aussi voisines, a un pouvoir d'analyse qui semble nettement supérieur à celui des courbes de précipitation à p_H constant. En relevant sur les courbes de la Fig. 3 la variation de la concentration en protéine avec la force ionique à une valeur de p_H pour laquelle ne correspond sensiblement pas de minimum, on obtient les courbes classiques de "salting-out" correspondantes. La Fig. 4 montre un tracé de ce genre pour les p_H

6.20, 5.75, 5.55. Il y a deux points d'infexion correspondant aux concentrations 2.341–2.375 M et 2.475–2.508 M. On pourrait en envisager un troisième entre 2.341 et 2.401 M.

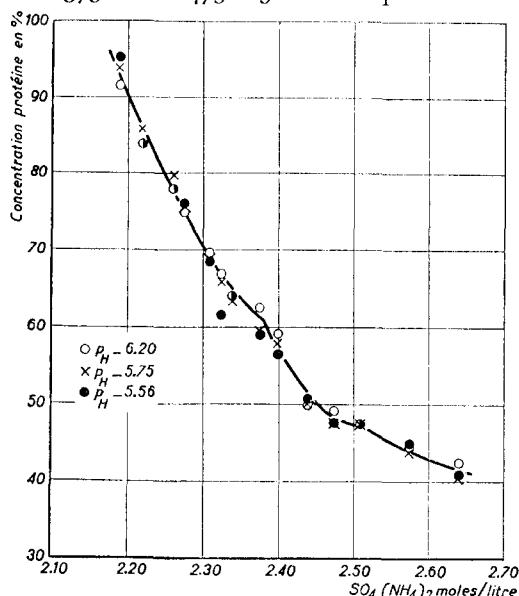


Fig. 4. Courbe de précipitation, à p_H constant et à force ionique variable, construite d'après la Fig. 3

Dans le cas particulier des protéines du groupe du myogène, notre méthode nous permet donc, dans les limites de p_H et de μ étudiées, de dénombrer les protéines du mélange, de préciser leurs points isoélectriques et d'indiquer leur inséparabilité par les méthodes ordinaires de précipitation.

Nous allons montrer maintenant qu'il

est possible de réaliser la séparation de certaines de ces protéines par cristallisation, en se basant sur les données du diagramme de solubilité.

B. CRISTALLISATION DES PROTÉINES DE LA FRACTION 2.008–2.341 M. L'ALDOLASE CRISTALLISÉE

Les fractions recueillies entre 2.008 et 2.341 M contiennent au moins cinq protéines de points isoélectriques 5.59–5.83–6.00–6.52 et 6.70, en proportions variables, suivant le p_H auquel se fait la précipitation.

Il nous a été possible d'obtenir, à l'état cristallisé, trois d'entre elles, correspondant aux minima 5.59, 5.83 et 6.00 (Fig. 5, 6, 7). Il suffisait, d'après ce que nous avons dit plus haut, d'arriver à la saturation en protéines à chaque point isoélectrique.

On précipite, par conséquent, à 22°C, en cinq opérations distinctes, la fraction 2.008–2.341 M aux p_H 5.59, 5.83, 6.00, 6.52 et 6.70, en utilisant les solutions précipitantes employées lors du tracé de la Courbe VII. Ces précipités sont centrifugés après agitation convenable, et les culots sont redissous dans le minimum d'eau. Cette dissolution doit être faite avec beaucoup de soin, afin de ne pas dépasser la limite de saturation en protéines amorphes. Après quelques jours de repos en glacière, les trois premières fractions donnent trois espèces différentes de cristaux.

Au p_H 5.59, on obtient de fines plaquettes pseudo-hexagonales.

Au p_H 5.83, il apparaît des aiguilles qui s'accolent en rosettes.

Au p_H 6.00, on reconnaît des bipyramides semblables aux cristaux de myogène A de BARANOWSKI²³.

Les fractions séparées aux p_H 6.52 et 6.70 sont extrêmement thixotropes et nous

D'après cette courbe, le mélange ne contiendrait donc que 3 constituants, alors que les courbes à p_H variable permettent d'en déceler 8. Même en admettant que les tracés de la Fig. 4 n'ont pas été obtenus avec la précision requise pour ce genre d'analyses (voisinage des p.i., erreurs sur l'évaluation des concentrations protéiniques d'une courbe à l'autre), ils montrent cependant avec quelle circonspection il faut analyser les courbes de précipitation à p_H constant, dans le cas de mélanges aussi complexes.

Dans le cas particulier des protéines du groupe du myogène, notre méthode nous permet donc, dans les limites de p_H et de μ étudiées, de dénombrer les protéines du mélange, de préciser leurs points isoélectriques et d'indiquer leur inséparabilité par les méthodes ordinaires de précipitation.

n'y avons pas observé de formation rapide de cristaux. Après un séjour prolongé en glacière, de très longues aiguilles sont apparues au pH 6.70, mais ce résultat n'a pu être reproduit.

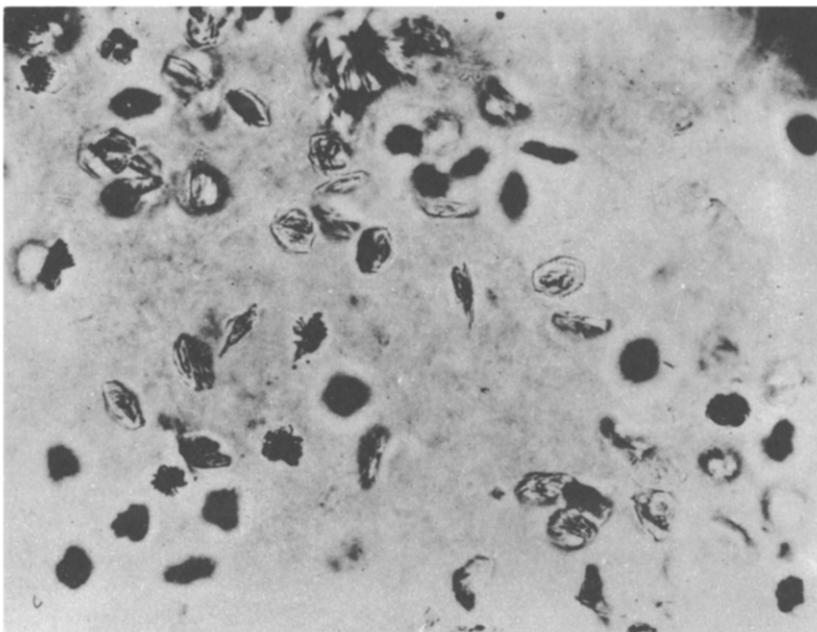


Fig. 5. Cristaux, en fines plaquettes, obtenus au pH 5.59



Fig. 6. Cristaux d'aldolase obtenus au pH 5.83

Les cristaux obtenus au pH 5.83 ont retenu particulièrement notre attention du fait qu'ils sont très semblables à l'aldolase cristallisée de muscles de rats obtenue par WARBURG ET CHRISTIAN²⁶. Il s'imposait donc de rechercher si nos cristaux possédaient cette activité enzymatique. On sait qu'elle est caractérisée par la scission de l'hexosediphosphate en 2 triose-phosphates. Nos cristaux ont été dissous, après centrifugation, dans

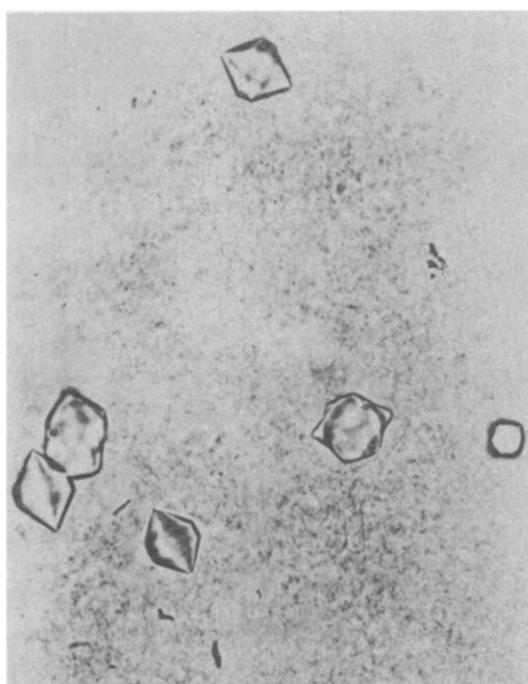


Fig. 7. Cristaux de myogène A de BARANOWSKI (?) obtenus au pH 6.00

obtenir de cristallisation. Par contre, les cristaux de myogène A de BARANOWSKI, obtenus au moyen d'une méthode de fractionnement extrêmement longue et difficile, possèdent, après plusieurs recristallisations, une activité de 7000. Notre échantillon de cristaux de première cristallisation contiendrait donc environ 38% d'aldolase pure. Le rendement de notre méthode de préparation est de 0.30 g de cristaux de première cristallisation par kg de muscle de Lapin.

C. CONTRÔLES ÉLECTROPHORÉTIQUES

On sait que l'ordre suivant lequel les différents constituants d'un mélange se répartissent dans un diagramme d'électrophorèse, est déterminé principalement par leurs points isoélectriques. Il en est de même dans le cas de nos courbes à μ constant et à p_H variable. Il y a donc, entre ces deux méthodes, une analogie qui facilite la comparaison des résultats. Leur rapprochement présente néanmoins de sérieuses difficultés. Les points isoélectriques voisins des protéines étudiées leur confèrent des mobilités peu différentes: leur séparation électrophorétique est malaisée. De plus, les p.i. mesurés à des forces ioniques élevées peuvent différer de ceux déterminés en présence de faibles concentrations. Ce second inconvénient paraît cependant moins important, comme le montre la comparaison de nos valeurs de p.i. avec celles de JACOB^{29, 30} obtenues par électrophorèse.

Nous n'avons pu faire, jusqu'à présent, que des vérifications partielles. Elles ont porté sur:

a) composition électrophorétique de l'extrait musculaire du type BARANOWSKI;

Bibliographie p. 276.

un tampon au borate (p_H 7.35) et dialysé contre le même tampon pendant 24 heures, en tubes de cellophane. Les mesures d'activité ont été faites à 38° C, en suivant le procédé décrit par HERBERT, GORDON, SUBAHMANYAN ET GREEN²⁷ qui consiste à capter par HCN les trioses-phosphates, au fur et à mesure de leur formation. La réaction est arrêtée par addition d'acide trichloracétique et on dose le P libéré par hydrolyse alcaline des trioses (NaOH N). Les dosages de phosphore ont été effectués par la méthode de ALLEN²⁸, au moyen du colorimètre de DUBOSCQ.

En prenant comme valeur d'activité le nombre de molécules-grammes de substrat détruites en une minute par 100000 g d'enzyme, on trouve, à 38° C, p_H 7.3, pour nos préparations, des chiffres allant de 2508 à 2700. HERBERT et collaborateurs²⁷ ont séparé du muscle, par fractionnement au $(NH_4)_2SO_4$, des fractions possédant une activité de 3300 mais n'ont pu

b) composition électrophorétique de certaines fractions caractéristiques obtenues en se basant sur nos données de solubilité;

c) propriétés électrophorétiques de l'aldolase cristallisée.

Les propriétés electrocinétiques des protéines musculaires ont été très étudiées par DUBUISSON ET JACOB^{29, 30, 31, 33}. La répartition des bandes électrophorétiques en divers groupes distincts a permis à JACOB²⁹ de baser sur cette distribution une classification des protéines musculaires. Nos recherches constituent une nouvelle contribution à cette étude. Nous utilisons, dans ce qui suit, la nomenclature de DUBUISSON ET JACOB^{29, 30, 33}, pour repérer les différents gradients électrophorétiques. L'appareillage a été décrit par DUBUISSON ET JACOB³²; il est du type TISELIUS-LONGSWORTH.

a. Extrait musculaire du type BARANOWSKI

Nous avons contrôlé les différents stades de la méthode préparative de BARANOWSKI.

a. Extrait aqueux: (Fig. 8, pH 7.45, μ 0.15, tampon phosphatique). La plupart des bandes décrites par DUBUISSON ET JACOB^{29, 33} sont visibles. On peut les ranger en trois groupes: un groupe rapide comprenant *h*, un groupe lent avec *k*, *l*, *m*, *n* et un groupe intermédiaire avec *i*, *sp*, *j*.

β. Précipité obtenu à 45% de saturation en $(NH_4)_2SO_4$, à 4° C: (Fig. 9, pH 7.61, μ 0.15, tampon phosphatique). La complexité de ce précipité est encore très grande. Les mesures de vitesse montrent qu'il se compose en majeure partie des protéines de mobilité intermédiaire entre *h* et *l*.

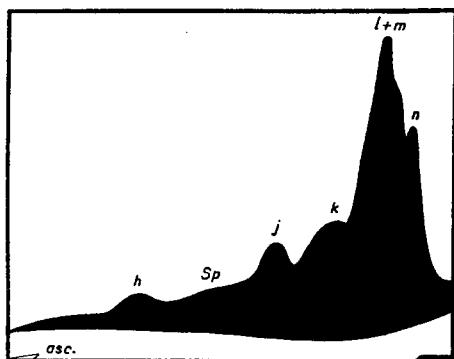


Fig. 9. Diagramme électrophorétique de la fraction de l'extrait aqueux de BARANOWSKI précipitable par $(NH_4)_2SO_4$ à 45% de saturation, au pH 7.61 μ 0.15, tampon phosphatique. Tracé ascendant.

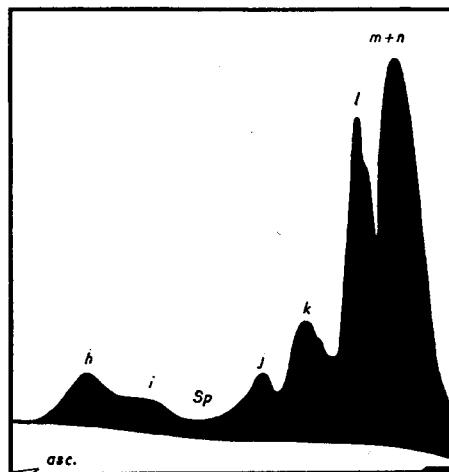


Fig. 8. Diagramme électrophorétique, du type TISELIUS-LONGSWORTH, de l'extrait aqueux de BARANOWSKI, au pH 7.45 μ 0.15, tampon phosphatique. Image ascendante.

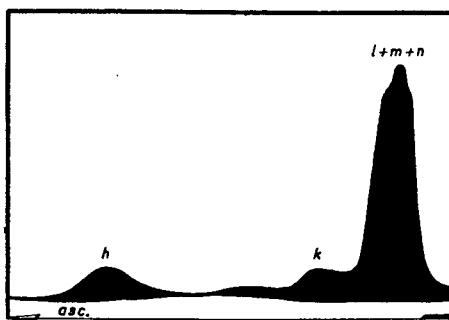


Fig. 10. Diagramme électrophorétique de l'extrait utilisé pour les mesures de solubilité, pH 7.51 μ 0.15 tampon phosphatique. Tracé ascendant.

γ. Extrait utilisé pour les mesures de solubilité: (Fig. 10, pH 7.51, μ 0.15, tampon phosphatique). Les bandes les plus importantes sont *h*, *k* et *l + m + n*. Bien que notablement moins complexe que l'extrait aqueux, l'extrait du type BARANOWSKI est

encore composé de nombreuses protéines. L'électrophorèse prolongée montre que les bandes principales sont en réalité complexes.

Les mobilités des gradients h , l , k , m , n de l'extrait salin sont identiques à celles déterminées pour l'extrait aqueux:

Valeurs cathodiques moyennes - p_H 7.45 - μ 0.15

	h	k	l	$m + n$
Extrait aqueux	5.40	1.79	1.22	0.82
Extrait type	5.45	1.77	1.25	0.84

Les points isoélectriques des protéines h , k , l , m et n , mesurés par JACOB^{29, 30}, par électrophorèse, sont à 0° C et μ : 0.15, respectivement 4.65 - 5.25 - 5.70 - 6.17 - 6.32 - 6.87.

La zone de p_H étudiée par nos courbes de solubilité à une force ionique 50 fois plus grande (22° C) s'étend de p_H 5.55 à p_H 6.75 et couvre donc approximativement la plupart des points isoélectriques possibles. La protéine h est nettement en dehors du domaine de p_H examiné. Il est à craindre d'ailleurs que des phénomènes de dénaturation ne compliquent des mesures de solubilité faites au p_H 4.65. Ajoutons que la solubilité de h étant très grande, sa précipitation n'a pas lieu dans les limites de concentrations salines étudiées.

b. Fractions isolées d'après nos diagrammes de solubilité

Les électrophorèses réalisées sur différentes fractions isolées d'après les indications du diagramme, sont en général très difficiles à interpréter. Le repérage des bandes repose uniquement sur des mesures de vitesse et on sait que les mobilités des bandes l , m et n sont très voisines et que leur séparation électrophorétique est difficile.

a. *Fractions précipitées entre 2.341 et 2.441 M (NH₄)₂SO₄*: d'après le diagramme de solubilité, les protéines auxquelles sont dus les minima à p_H 6.52 et 6.70, sont précipitées entre 2.008 et 2.34 M et sont absentes dans les précipités recueillis entre 2.341 et 2.441 M.

L'électrophorèse montre que les gradients n et m ne sont pas présents dans la fractions 2.341-2.441 et que cette fraction contient surtout des constituants k et l .

b. *Fractions recueillies entre les p_H 6.60 et 6.70, aux concentrations 2.192, 2.225 et 2.258 M (NH₄)₂SO₄*: nous avons essayé de recueillir, entre les p_H 6.60 et 6.70, à force ionique constante, un précipité qui, théoriquement, devrait être enrichi en la protéine correspondant au minimum de p_H 6.70. Les précipités obtenus à p_H 6.60 aux différentes concentrations en (NH₄)₂SO₄, sont éliminés; la solution est amenée au p_H 6.70 par addition de Na₂HPO₄ et d'H₂O, de façon à ne pas modifier la force ionique. Il se forme un léger précipité que l'on centrifuge. Les précipités obtenus à 2.192, 2.225 et 2.258 M (NH₄)₂SO₄ sont réunis et l'électrophorèse montre un enrichissement en protéines m et n .

De ces résultats, il ressort que les minima à p_H 6.52 et 6.70 sont, selon toute vraisemblance, dus à des protéines des groupes m et n .

c. L'aldolase cristallisée

En comparant l'électrophorèse d'un extrait total du type BARANOWSKI avec celle du même extrait additionné d'une certaine quantité de cristaux d'aldolase, nous avons pu identifier la composante principale de nos préparations d'enzymes avec la bande l .

Nous avons fait deux séries d'électrophorèses, l'une à p_H 6.83, μ 0.1 où la séparation de n et m est nette, l'autre à p_H 7.67, μ 0.1 où l et m se séparent facilement.

A p_H 6.83 (μ 0.1, tampon phosphatique: Fig. 11), les bandes *l* et *m* sont confondues; les bandes *n* et *k* sont bien visibles. Les mesures de surface montrent que l'accroissement de concentration porte sur l'ensemble *l* + *m*.

A p_H 7.61 (μ 0.1, tampon phosphatique: Fig. 12), les bandes *n* et *m* sont réunies et *l* se sépare nettement. Les mesures de surface indiquent une augmentation importante du gradient *l*. La bande *m* + *n* s'est accrue de 3%, la bande *l* de 16%, par rapport aux gradients correspondant de l'extrait simple. La préparation cristalline étudiée contenait donc 85% environ de substances migrant au niveau de *l*.

De nombreuses mesures de vitesse indiquent que la bande *l* des extraits du type BARANOWSKI est en réalité complexe et qu'elle est composée de substances ayant des mobilités comprises entre 1.10 et $1.40 \cdot 10^{-5}$ cm/volt/sec. Le point isoélectrique de *l*,

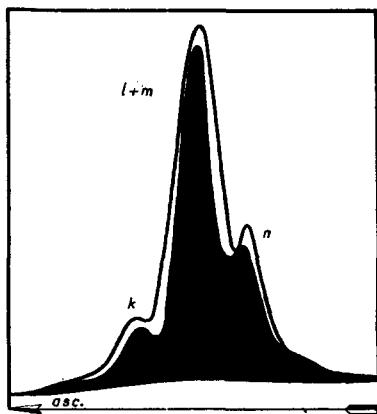


Fig. 11. Différences entre le diagramme électrophorétique d'un extrait total du type BARANOWSKI (diagramme noir) et le diagramme électrophorétique du même extrait additionné d'aldolase cristallisée (diagramme clair), au p_H 6.83 μ 0.10, tampon phosphatique. Tracés ascendants. L'accroissement de concentration porte sur l'ensemble *l* + *n*.

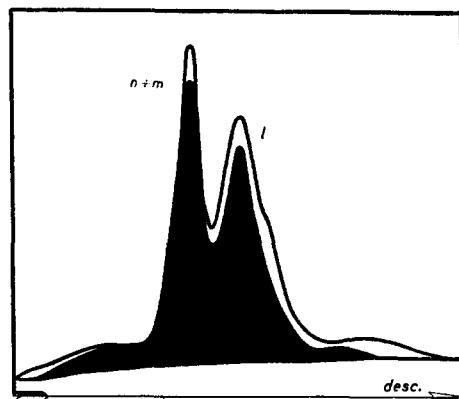


Fig. 12. Même expérience que celle de la Fig. 11, mais le p_H est de 7.61 et le tracé est descendant. La présence de l'aldolase est surtout marquée par *l*.

mesuré par JACOB²⁹ est 6.12; le minimum de solubilité, d'après nos courbes, se produit à 5.83 pour l'aldolase. Il nous paraît justifié, en tenant compte de ce qui précède, de dire que les protéines correspondant aux minima 5.95, 6.00, 6.07 appartiennent également à la bande *l*.

Ajoutons encore que le myogène A, préparé à p_H 5.9 par la méthode décrite par BARANOWSKI²³, présente, à l'électrophorèse, une bande principale migrant avec la vitesse de *l*.

A la lumière de ces résultats préliminaires, la correspondance entre les minima de solubilité et les bandes électrophorétiques s'établit provisoirement selon le schéma:

Minima . . .	5.59	5.71	5.83	5.95	6.00	6.07	6.52	6.70
Bandes . . .		<i>k</i>		<i>l</i>			<i>m</i>	<i>n</i>

aldolase *myogène A*

En conclusion, la méthode de courbes de solubilité que nous avons décrite ne peut certes pas résoudre complètement le problème très compliqué de la séparation des protéines par précipitation saline (salting-out). Il ressort cependant de nos résultats que

l'étude complète de la solubilité d'un mélange de protéines en fonction du p_{H} et de la force ionique peut, dans le cas de substances de points iso-électriques voisins et de solubilités voisines, servir à éclairer grandement la question des limites de précipitation et en même temps servir à déterminer les conditions les meilleures à la cristallisation éventuelle.

Nous remercions bien vivement Monsieur le Professeur DUBURSSON de l'intérêt qu'il n'a cessé de prodiguer à ce travail et les très nombreux conseils qu'il a bien voulu nous donner. Nos remerciements vont également au Professeur D'OR, qui a eu la grande obligeance de mettre à notre disposition le réfractomètre que nous avons utilisé. Le personnel du Laboratoire de Biologie générale, qui a contribué aux expériences par une aide technique inappréciable, a droit à toute notre gratitude.

RÉSUMÉ

1. L'examen des courbes de solubilité en fonction du p_{H} et à force ionique constante, établies pour un extrait musculaire de Lapin, nous a permis de suivre la précipitation de 8 constituants et d'en déterminer les points isoélectriques: 5.59, 5.71, 5.83, 5.95, 6.00, 6.07, 6.52, 6.70.
2. Les données de solubilité nous ont conduit à l'obtention, dans une première fraction, de 3 protéines cristallisées, définies par les points isoélectriques 5.59, 5.83 et 6.00.
3. L'espèce cristalline de p.i. 5.83 présente une activité aldolasaïque et peut être identifiée avec l'aldolase cristallisée isolée par WARBURG ET CHRISTIAN à partir de muscles de Rats; elle correspond à la bande électrophorétique *l* de JACOB.
4. La correspondance entre les protéines décelées par nos mesures de solubilité et les bandes électrophorétiques observées dans nos extraits musculaires a été partiellement établie.

SUMMARY

1. Study of the curves of solubility as a function of p_{H} at constant ionic strength enables one to follow the precipitation of 8 components from a rabbit muscle extract, and to determine their isoelectric points: 5.59, 5.71, 5.83, 5.95, 6.00, 6.07, 6.52, 6.70.
2. The solubility data have led to the isolation from a first fraction of three crystalline proteins defined by isoelectric points at 5.59, 5.83 and 6.00.
3. The crystalline preparation of isoelectric point 5.83 has a very significant aldolase activity, and perhaps it is to be identified with the crystalline aldolase isolated by WARBURG AND CHRISTIAN from rat muscles; it corresponds to JACOB's electrophoretic band *l*.
4. The correspondence between the proteins revealed by our solubility measurements and the electrophoretic bands observed in our muscle extracts has been partially established.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Untersuchung der Löslichkeitskurven als Funktion der p_{H} bei konstant gehaltener Ionstärke ermöglichte uns die Präzipitation von 8 Komponenten aus einem Muskelextrakt des Kaninchens zu verfolgen und die isoelektrischen Punkte dieser Komponenten zu bestimmen: 5.59, 5.71, 5.83, 5.95, 6.00, 6.07, 6.52, 6.70.
2. Die Löslichkeitsdaten liessen uns in einer ersten Fraktion drei kristallisierte Eiweisskörper erhalten, die durch die isoelektrischen Punkte 5.59, 5.83, und 6.00 definiert sind.
3. Die Kristallart des i.P. 5.83 hat eine Aldolaseaktivität und kann mit der kristallisierten Aldolase, die von WARBURG UND CHRISTIAN aus Rattenmuskeln isoliert wurde, identifiziert werden; sie entspricht der elektrophoretischen Fraktion *l* von JACOB.
4. Der Zusammenhang zwischen den durch unsere Löslichkeitsmessungen erhaltenen Eiweissen und den in unseren Muskelextrakten beobachteten elektrophoretischen Fraktionen wurde teilweise deutlich.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. J. COHN, *Physiol. Rev.*, 5 (1925) 349.
- ² Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 26 (1944) 1091.
- ³ Y. DERRIEN, *Svensk Kemisk Tidsskrift*, 59 (1947) 139.

- 4 J. ROCHE, Y. DERRIEN ET S. MANDEL, *C. R. Soc. Biol.*, 138 (1944) 515.
- 5 J. ROCHE, Y. DERRIEN ET S. MANDEL, *C. R. Soc. Biol.*, 139 (1945) 101.
- 6 J. ROCHE, Y. DERRIEN ET S. MANDEL, *C. R. Acad. Sc.*, 220 (1945) 572.
- 7 S. S. FALCONER ET D. B. TAYLOR, *Biochem. J.*, 40 (1946) 835.
- 8 E. COHN ET J. L. HENDRY, *J. Gen. Physiol.*, 5 (1923) 521.
- 9 S. SØRENSEN ET S. SLADEK, *Kolloid-Z.*, 49 (1929) 16.
- 10 K. LINDERSTRÖM-LANG ET S. KODAMA, *C. R. Lab. Carlsberg*, 1 (1925) 16.
- 11 K. LINDERSTRÖM-LANG ET S. KODAMA, *C. R. Lab. Carlsberg*, 9 (1928) 17.
- 12 S. SØRENSEN ET M. SØRENSEN, *C. R. Lab. Carlsberg*, 9 (1928) 17.
- 13 S. SØRENSEN ET M. SØRENSEN, *Biochem. Z.*, 16 (1933) 258.
- 14 S. SØRENSEN ET M. HØYRUP, *C. R. Lab. Carlsberg*, 12 (1917) 213.
- 15 A. A. GREEN, *J. Amer. Chem. Soc.*, 60 (1938) 1108.
- 16 A. A. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 83 (1931) 495.
- 17 A. C. R. GRÖNWALL, *C. R. Lab. Carlsberg*, 24 (1942) 185.
- 18 H. HEWITT, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1540.
- 19 H. BIERRY, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 24 (1942) 1027.
- 20 M. MACHEBOEUF, *Thèse de Sciences*, Paris 1928, cité d'après 21 et 22.
- 21 SANDOR, BONNEFOI ET PEREZ, *C. R. Acad. Sc.*, 197 (1934) 1254.
- 22 J. PEREZ, *Act. sc. et ind.*, Hermann no. 872.
- 23 T. BARANOWSKI, *C. R. Soc. Biol.*, 130 (1939) 1182.
- 24 M. DUBUSSON ET A. DEBOT, *Arch. intern. Physiol.*, 50 (1940) 54.
- 25 BJERRUM, *Z. Elektrochem.*, 17 (1911) 389.
- 26 O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 149 (1943) 314.
- 27 HERBERT, GORDON, SUBAHMANYAN ET GREEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1108.
- 28 R. ALLEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 858.
- 29 J. JACOB, *Biochem. J.*, 41 (1947) 83.
- 30 J. JACOB, *Biochem. J.*, 42 (1948) 71.
- 31 J. JACOB, *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 1945, no. 4, 242.
- 32 M. DUBUSSON ET J. JACOB, *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 1945, no. 3, 133.
- 33 M. DUBUSSON, *Expès annuels de Biochim. Méd.*, Fasc. IX, Paris, Masson, 1948.

Reçu le 23 mars 1948