

RECHERCHES SUR LA NATURE ET LA SIGNIFICATION DE LA PROTÉINE GRAM DU GAMÈTE MÂLE D'ASCARIS MEGALOCYPHALA

par

JACQUES PANIJEL*

*Laboratoire de Morphologie animale et de Physiologie cellulaire
de la Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles (Belgique)*

I. GÉNÉRALITÉS

Dans une série de travaux précédents, nous avons signalé l'intérêt présenté par le complexe protéique du gamète mâle d'*Ascaris megalocephala*, dont le comportement à la fécondation, comme la colorabilité Gram indiquent qu'il joue un rôle important dans la synthèse des ribonucléoprotéines^{23, 23, 24, 25, 26}. Nous avons ainsi été conduit à attribuer à cette protéine la signification d'un "vitellus exogène" dont la métabolisation par l'œuf lors de la fécondation présente les caractères d'une véritable recharge, comparable à bien des égards à ce que l'on peut rencontrer lors des recharges d'unicellulaires en voie de synthèse protéique active²⁷.

C'est à FAURÉ-FREMIET¹⁰ que revient le mérite d'avoir isolé cette substance et d'avoir démontré son caractère protéique; cet auteur a particulièrement insisté sur une de ses propriétés les plus curieuses: sa solubilité à chaud, qui, située vers 52° dans l'eau pure, varie cependant selon la solution saline utilisée pour laquelle les anions se rangent dans l'ordre même de la série lyotrope de HOFFMEISTER¹¹. Par ailleurs CHAMPETIER ET FAURÉ-FREMIET⁸ ont étudié les diagrammes de rayons X de ce complexe, qui font apparaître un état semi-cristallin et un état amorphe, la fusion de l'édifice structuré démontrée par les transformations thermiques s'accompagnant de la disparition des forces de réseau qui assurent latéralement la liaison des chaînes de valence principale.

Malgré cette étude assez complète, effectuée par FAURÉ-FREMIET et ses collaborateurs, il importait de reprendre ces recherches dans le cadre des résultats biochimiques que les travaux effectués par PASTEELS et nous même, soit isolément (ci-dessus et ²⁸⁻²⁹) soit en collaboration^{27, 30} ont permis d'obtenir.

Nous présentons ci-dessous les premiers résultats ainsi obtenus, qui, à beaucoup d'égards, devraient encore être précisés, des circonstances tout-à-fait indépendantes de notre volonté nous ayant interdit de disposer d'une quantité de matériel suffisante pour donner à ces recherches toute l'extension désirable**.

* Adresse actuelle: Service de Biochimie; Institut du Cancer, Villejuif, Paris (France).

** Nous avons, en effet, été très violemment sensibilisés à l'*Ascaris*, au point de ne pouvoir, sans trouble grave, traverser une pièce, où même plusieurs heures auparavant aurait été déposé un de ces animaux.

II. EXTRACTION ET IDENTIFICATION

Les testicules prélevés sont congelés et lyophilisés; puis une première fraction est éliminée par extraction à l'eau froide: elle consiste essentiellement en deux complexes albuminiques coagulables à 47° et 70° et un complexe euglobulinique coagulable à 58°. On vérifie que les gamètes ont conservé leur morphologie et notamment leurs inclusions protéiques. On procède alors à l'extraction en suivant les indications précédemment données par FAURÉ-FREMIET. La purification est effectuée par trois remises en solution à 60° et reprecipitations successives. Après séchage à l'alcool et à l'éther, on obtient une fine poudre blanche homogène, dont l'identification aux "grains brillants" observés *in vivo* est assurée par les caractères suivants:

a. Solubilité à 60° dans l'eau et reprecipitation sous forme de globules réfringents comparables aux grains brillants.

b. Colorabilité très vive par la méthode de GRAM des globules isolés (Fig. 1 A), analogue à celle des grains brillants sur préparations (Fig. 1 B); rappelons que, par une méthode comparable, CLAUDE⁵ démontre l'identité des "large granules" isolés par centrifugation avec les mitochondries observables sur préparations, en mettant à profit leur colorabilité identique par le vert Janus.

Signalons par ailleurs, dès maintenant, que les phénomènes de dissolution et de reprecipitation de la protéine sont réversibles dans certaines limites: le complexe est en effet dénaturé, soit par chauffage excessif, soit par centrifugation trop rapide ou trop prolongée lors de la reprecipitation, soit par mise en solution prolongée, soit par vieillissement. Nous reviendrons ci-dessous sur la signification éventuelle de cette dénaturation.

III. COMPOSITION

Toutes les analyses ont été faites en double exemplaire, et le plus souvent à la fois sur un échantillon récemment préparé (P.F.) et sur un échantillon dénaturé par vieillissement (P.D.).

A. Comportement à l'électrophorèse*

La nature même de la substance rend l'étude électrophorétique particulièrement malaisée: en effet, comme nous le verrons, la protéine aisément soluble à chaud dans l'eau et *a fortiori*, dans les solutions tampon, n'est soluble à froid qu'en milieu très alcalin.

Dans une première série d'expériences, la préparation P.F. (10 mg/2 ml) a été dissoute en milieu NaOH 0.05 M — NaCl 0.05 M; pH (mesuré à l'électrode platine-hydrogène): 12.4. Vitesse de migration: $14.5 \cdot 10^{-5}$ cm/v/s. Temps d'électrophorèse: 24 000 secondes. On voit d'après l'allure dissymétrique de l'écrasement (Fig. 2), qu'il est difficile de conclure à l'homogénéité de la substance. Une telle configuration du gradient électrophorétique peut être due, soit à la présence de plusieurs constituants de pH très

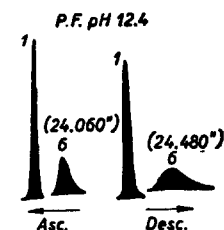


Fig. 2. Diagramme d'électrophorèse en solution alcaline

* Cette étude d'électrophorèse a été effectuée au laboratoire du professeur DUBUISSON à qui nous tenons à exprimer tous nos remerciements et notre gratitude pour l'extrême amabilité de son accueil et le prix incomparable de ses avis.

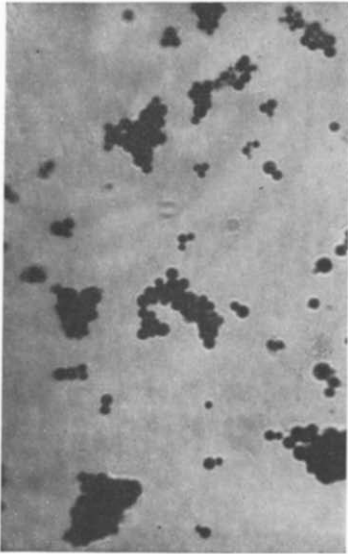


Fig. 1A. Grains brillants isolés colorés par le Gram

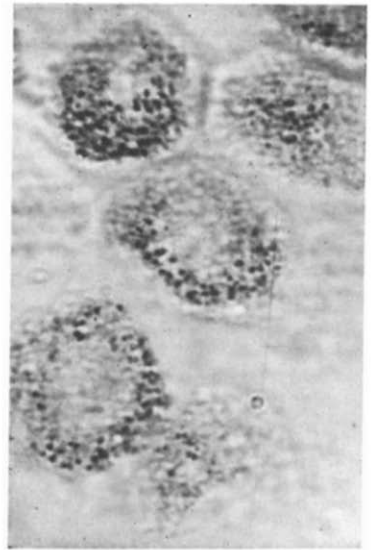


Fig. 1B. Spermatocytes avec leurs grains brillants colorés par le Gram

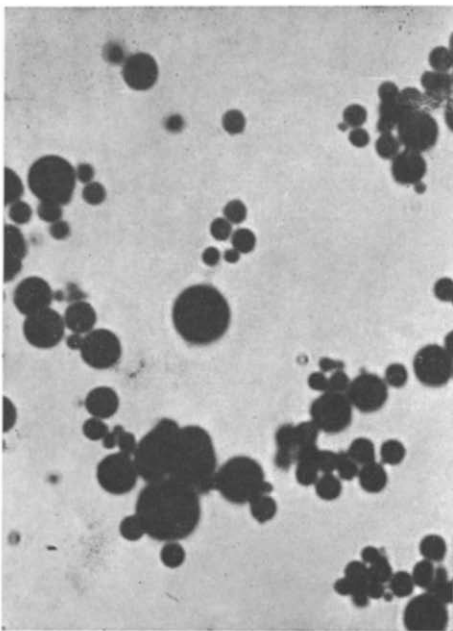


Fig. 1C. Grains brillants colorés par le Gram après dénaturation

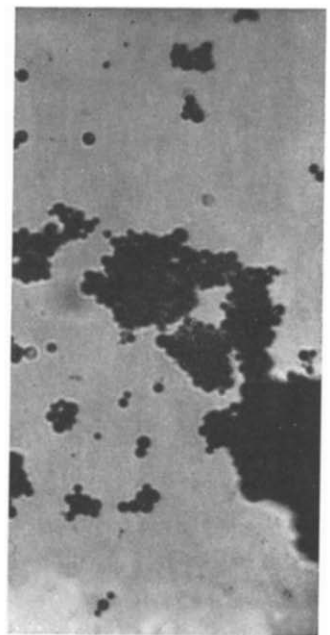


Fig. 1D. Grains brillants colorés par le Gram après régénération

voisins, soit, par suite du pH très élevé utilisé dans l'expérience, au trop grand éloignement des pH_1 et par suite à une différenciation défectueuse par le champ électrique.

Il importait par conséquent d'effectuer l'électrophorèse dans des conditions de pH plus favorables. Nous avons procédé à la dissolution des préparations de la façon suivante: mise en solution en $NaOH$ 0.15 N puis addition de HCl 0.15 N en maintenant la solution à 40° ; dans ces conditions, il a été possible d'amener les solutions aux environs de pH 7.6; malheureusement nous n'avons pu disposer d'une quantité tout-à-fait suffisante pour porter une conclusion absolument décisive en ce qui concerne la préparation P.F.

Préparation P.D.: 10 mg/2 ml. Tampon PO_4H_2Na 0.048 M — PO_4H_2Na 0.006 M pH 7.66; 8160 secondes d'électrophorèse; vitesse de migration: $9.6 \cdot 10^{-5}$ cm/v/s. La substance apparaît homogène (Fig. 3A).

Préparation P.F.: 6 mg/2 ml. Tampon PO_4H_2Na 0.048 M — PO_4H_2Na 0.006 M ; pH 7.73; 7740 secondes d'électrophorèse; vitesse de migration: $5.48 \cdot 10^{-5}$ cm/v/s. La concentration en protéine est trop faible pour permettre une conclusion définitive, mais l'homogénéité est très hautement probable (Fig. 3B).

Les quantités limitées de substance dont nous disposons ne permettaient pas de

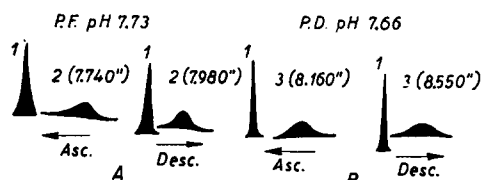


Fig. 3A. Diagramme d'électrophorèse de la protéine fraîche P.F.; B. Diagramme d'électrophorèse de la protéine dénaturée P.D.

multiplier les expériences à des pH suffisamment voisins pour pouvoir par extrapolation déterminer le pH_1 . Mais il ressort des deux expériences ci-dessus (et *a fortiori* de la première) que P.F. comme P.D. sont électropositives parce que le pH_1 est nettement plus bas que le pH des expériences. Il semble donc que le pH_1 est nettement acide (par exemple entre pH 5 et 6) et plus bas chez P.D. que chez P.F. Nous verrons

ultérieurement que cette conclusion est entièrement confirmée par la composition comme par le comportement de la protéine.

L'étude électrophorétique permet donc de conclure que l'homogénéité de la protéine est très vraisemblable. Ce n'est pas dire cependant qu'on soit en droit d'affirmer que les préparations utilisées soient celles d'une protéine pure; une certitude absolue ne pourrait résulter que de l'application du test de NORTHROP²⁰, mais là encore, aussi bien les curieuses propriétés de solubilité que les petites quantités de substance à notre disposition nous ont interdit l'utilisation de la méthode.

B. Analyse

I. L'analyse élémentaire a été faite sur les préparations récente P.F. et dénaturée P.D. en double exemplaire, après dessiccation à 120° .

On trouve:

C: 49.07%

H: 5.87%

N: 17.45% (le micro-Dumas et le micro-Kjeldahl donnent le même valeur).

Cendres: 0.62%

P: 0.020% (Méthode de BERENBLUM ET CHAIN¹)

S: néant.

Le chiffre très faible de P confirme les résultats de l'étude cytochimique²³ selon laquelle la substance étudiée n'est pas une nucléoprotéine.

Bibliographie p. 92/93.

L'analyse qualitative des cendres a été faite par un spectre d'émission en U.V.* On note sur le cliché les raies suivantes:

Mg: 2795.54 Å	Cu: 3247.55 Å	Ca: 3933.67 Å
2802.71 Å	3273.97 Å	3968.47 Å
2852.13 Å		

Il est possible que le Cu provienne des appareils utilisés lors de l'extraction.

2. La substance ne contient ni lipides, même après extraction prolongée à chaud par les solvants usuels, ni sucres réducteurs (Méthode de FOLIN ET MALMROS¹³). En particulier, elle ne contient pas de pentose (méthode de DAVIDSON ET WAYMOUTH⁷) ni de desoxypentose (méthodes de DISCHE⁹ et de STUMPF³⁷). Ce dernier résultat confirme donc bien les renseignements apportés par l'étude cytochimique et le dosage de P: la substance n'est en aucune façon une nucléoprotéine.

3. L'analyse des acides aminés a été effectuée sur P.F. et P.D. par chromatographie de partage à deux dimensions sur papier WHATMANN No 4, en utilisant comme couples de solvants soit collidine-phénol, soit collidine-butanol⁶⁻⁸. Le phénol est utilisé à 80% d'eau. La collidine et le butanol sont saturés. Avant chromatographie, on ajoute quelques gouttes de NH₃ dans les cuves. Dans le fond du bac à chromatographier, on ajoute quelques cristaux de CNK avant parcours du phénol. L'hydrolyse est effectuée en tubes scellés par 5 volumes de HCl 6 N à 120° pendant 30 heures. On évapore à sec, et on reprend par un minimum d'eau.

Au point de vue qualitatif nous avons identifié: avec certitude: acide aspartique, acide glutamique, glycocholle, alanine, sérine, tyrosine, arginine, lysine, phénylalanine valine, leucine, norleucine; avec probabilité: hydroxyproline, isoleucine, thréonine.

Le tryptophane est évidemment absent dans le chromatogramme, par suite de sa destruction lors de l'hydrolyse acide, mais on verra ci-dessous qu'une quantité non négligeable a pu en être dosée par la méthode de SHAW ET MACFARLANE³⁵. Les méthodes de chromatographie spéciale des acides aminés soufrés^{4, 41} n'ont évidemment rien donné, comme on pouvait s'y attendre.

Nous avons cherché à apprécier quantitativement les acides aminés ainsi détectés, en adaptant à la chromatographie sur papier la méthode de mesure à la ninhydrine mise au point par MOORE ET STEIN¹⁹: grâce à un chromatogramme pilote effectué dans des conditions exactement identiques au chromatogramme d'analyse, les différents acides aminés, ou groupes d'acides aminés, sont repérés, récupérés par dilacération du papier dans un minimum d'eau et agitation prolongée, puis dosés à la ninhydrine sur un aliquot. Un témoin est effectué sur un blanc de papier contigu à la zone ainsi analysée, après qu'on se soit assuré que, sur toute la bordure de la zone découpée, la vaporisation de ninhydrine à 0.1% dans le butanol utilisée pour la révélation des taches ne donnait aucune coloration. Nous décrivons ailleurs avec plus de détail les conditions d'utilisation de cette technique. Dans le cas précis des hydrolysats de la substance étudiée ici, le petit nombre d'essais qu'il nous a été possible de faire en raison des très minimes quantités dont nous disposions nous interdit de considérer l'analyse faite comme ayant un caractère quantitatif précis. En particulier nous n'avons pu relever de différence notable entre P.F. et P.D. Toutefois, l'appréciation a été suffisante pour que quelques grands

* Nous tenons à remercier Mr. DIDIER BERTRAND pour son aimable accueil lors de l'exécution de ce cliché.

faits se dégagent de cette analyse, faits qui confirment essentiellement les données obtenues par ailleurs:

- a. absence d'acides aminés souffrés.
- b. pourcentage considérable d'acides aminés dicarboxyliques: environ 35% dont moins de 5% sous forme d'acide glutamique, le reste sous forme d'acide aspartique*.
- c. pourcentage important d'acides aminés aromatiques: la tyrosine, la phényl-alanine et le tryptophane (ce dernier dosé sur hydrolysate alcalin par la méthode de SHAW ET MACFARLANE³⁵) représentent près de 15%.
- d. Alanine: 5%; glycocholate: 4%; groupe des leucines: 10%.
- e. pourcentage remarquablement faible des acides aminés basiques qui n'atteint pas 5%.

4. Il ressort donc de cette analyse que la protéine est une protéine acide: nous ne connaissons pas d'autre exemple de protéine dont le pourcentage en acide aspartique soit aussi considérable. Le taux élevé de *N* ne doit donc pas être nécessairement pris pour une preuve de basicité des protéines: le chiffre remarquablement faible d'acides aminés basiques, aussi bien que le pourcentage non négligeable de tryptophane (de 2 à 3%) confirment les données de l'électrophorèse, ainsi que les renseignements apportés par l'étude des réactions cytochimiques (forte affinité pour les colorants basiques) et des conditions de solubilité dans la soude (*cf.* ci-dessous): une telle protéine n'a rien à voir avec les protéines du type histone. Ajoutons par ailleurs que l'emploi du réactif sulfo-mercurique de MIRSKY ET POLLISTER¹⁸ combiné à la réaction de MILLON ne permet nullement la mise en évidence de deux protéines différentes, puisque la substance est insoluble dans le réactif.

Signalons enfin que cette protéine diffère également de la protéine isolée par HENRY ET STACEY¹⁶ et qui, selon ces auteurs, interviendrait dans le complexe Gram des bactéries: cette dernière présente en effet un chiffre de *N* plus faible (inférieur à 15%), mais du *S* en quantité appréciable et se comporterait comme une protéine basique.

Le résultat de l'analyse des acides aminés suggère fortement un rapprochement (limité bien entendu à la composition seule) avec la pepsine dont cependant les propriétés acides sont beaucoup plus fortes (pH 2.7).

C. Etude spectrographique en U.V.

[Cette étude a été faite sur BECKMANN, en solutions de soude de concentration plus ou moins forte, sur P.F. et P.D.

Les spectres, effectués entre 2300 Å et 3000 Å sont reproduits dans les figures 4A et B. En 4A, sont portés les spectres des préparations de la protéine récemment préparée P.F. dissoutes en soude *N*/150 (P.F. 1: 0.22 mg/ml; P.F. 2: 0.25 mg/ml; P.F.3: 0.30 mg/ml) ou *N*/10 (P.F.4: 0.16 mg/ml). En 4B, sont portés les spectres de la protéine P.D. dissoute à froid en soude *N*/10 (P.D.1: 0.5 mg/ml), ou en soude *N*/5 (P.D.2: 0.4 mg/ml).

L'examen de ces spectres permet de faire plusieurs remarques d'intérêt non négligeable:

- a. Il est possible qu'il n'y ait pas de différence entre les spectres de la protéine récente P.F. et de la protéine dénaturée P.D. La différence observée tient sans doute aux différences de solubilité des deux préparations (*cf.* P.F.4).

* Il est probable qu'une partie de ces acides dicarboxyliques résulte de la transformation d'amides lors de l'hydrolyse. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la contradiction existant entre le taux élevé de *N* de cette protéine et le chiffre relativement faible auquel conduit l'appréciation de *N* d'après la composition en amino acides.

b. En effet, on sait que, d'une façon générale, le spectre de la tyrosine est modifié dans le sens d'un accroissement du maximum et de son déplacement de 2740 Å (en solution légèrement acide) aux environs de 2900 Å en solutions alcalines de normalité assez élevée (de 0.1 *N* et au delà). Il est tout à fait probable que le fort maximum à 2800 Å des spectres effectués en de telles solutions de soude est dû à un phénomène de cet ordre.

c. On sait que le tryptophane (dont le spectre est peu sensible aux variations de pH) possède trois bandes caractéristiques, la plus importante voisine de 2800 Å, et se confondant évidemment en solution alcaline avec le maximum de la tyrosine. Mais dans

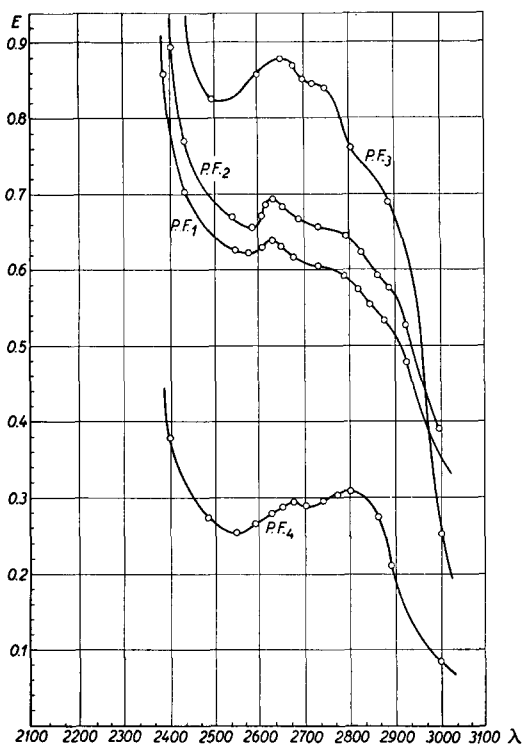


Fig. 4A. Spectre U.V. de la protéine fraîche P.F.

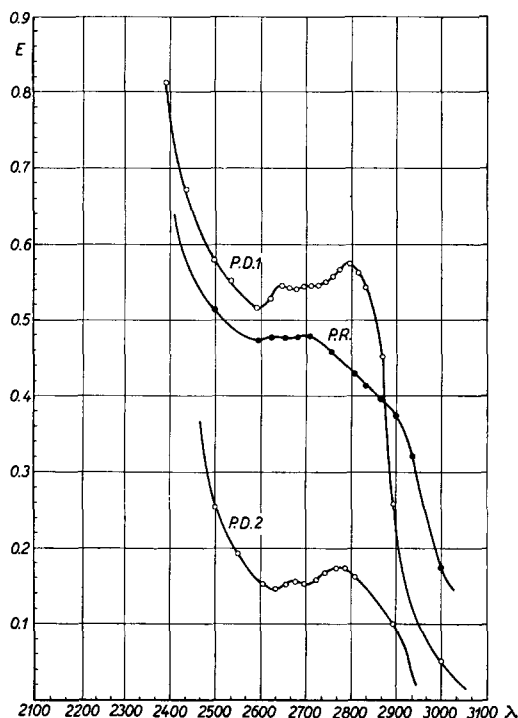


Fig. 4B. Spectre U.V. de la protéine dénaturée P.D. et régénérée P.R.

le cas présent le palier à 2650 Å des spectres effectués en soude *N*/10 et *N*/5 est en réalité un maximum masqué en solution alcaline par le maximum à 2800 Å et n'a rien à voir avec la 1^{re} bande du tryptophane; car en ce cas, et même en solution alcaline faible, la bande principale du tryptophane (2^o maximum) devrait s'observer (ainsi d'ailleurs que la 3^o bande, d'intensité cependant très comparable à la première).

d. Nous nous sommes demandés si la bande à 2650 Å ne pouvait pas être due à la présence en faible concentration de bases puriques ou pyrimidiques. A cet effet nous avons d'abord effectué une étude systématique des conditions de dosage des bases azotées par la méthode spectrographique, étude qui sera exposée ailleurs en détail. Indiquons ici les résultats essentiels:

1. Le spectre déjà sensible aux variations de pH perd sa valeur caractéristique,

lorsque la molarité des solvants d'extraction usuelle des acides nucléiques est trop élevée pour une concentration donnée d'acide nucléique.

2. Le spectre est profondément modifié lorsque des protéines sont présentes et au delà d'un certain rapport (N total/N des azotées bases) voisin de 30 le maximum caractéristique cède la place à un palier, puis disparaît complètement.

Dans cette perspective, nous avons cherché à voir si la bande à 2650 Å observée

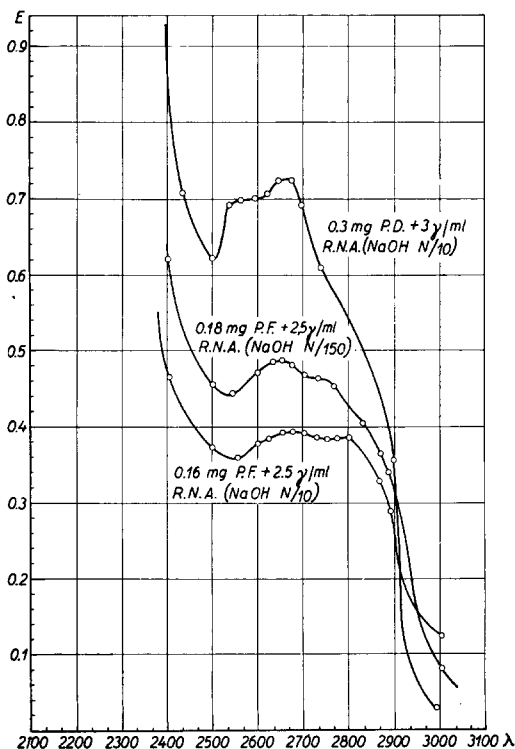


Fig. 5. Spectre U.V. de mélanges "protéine (P.F. ou P.D.) + acide ribonucléique"

dans les spectres de la protéine serait modifiée après addition à la solution de petites quantités d'acide ribonucléique. Les résultats sont indiqués dans les spectres de la Fig. 5: on voit que les changements sont somme toute peu marqués aussi bien avec P.D. en solution de soude $N/10$ (0.3 mg/ml de protéine + 3 γ /ml de R.N.A.) qu'avec P.F. en solution de soude $N/150$ (0.18 mg/ml de protéine + 2.5 γ /ml de R.N.A.) ou en solution de soude $N/10$ (0.16 mg/ml de protéine + 2.5 γ /ml de R.N.A.).

Ces différents résultats et la comparaison avec de nombreux spectres reproduits dans la littérature concernant des protéines pures ne s'opposent pas à la présence, en faible concentration, de bases azotées dans la substance étudiée.

Le dosage des bases puriques effectué par précipitation cuivrique suivant la microméthode de VENDRELY³⁸ confirme ce résultat et indique 0.20% de N purique: on voit donc que le rapport (N total/N purique) s'établit nettement au dessous de la valeur critique au delà de laquelle la méthode de dosage spectrographique présente d'incontestables difficultés d'interprétation.

IV. ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

A. Dénaturation et régénération

1. Une des propriétés les moins curieuses de la protéine étudiée n'est pas celle qui tient aux conditions de dénaturation et de régénération. FAURÉ-FREMIET¹⁰ a montré, en effet, que la dénaturation, qui se manifeste non seulement par la perte de la propriété de solubilité en eau chaude, mais également par divers changements d'aspect (aspect grumeleux ou corné, jaunissement etc. . .), se produit aisément, soit par centrifugation excessive des suspensions, soit par maintien trop prolongé en solution, soit même par simple vieillissement de la poudre sèche. Or il est possible de "régénérer" la protéine en la reprecipitant par neutralisation d'une solution de soude ou de formamide.

En réalité, nous ignorons quelle est l'étendue exacte de cette "régénération". Nous devons par conséquent nous en tenir essentiellement aux propriétés observables. Les

différences existant entre protéine fraîche et protéine dénaturée et que fait disparaître la "régénération" sont les suivantes:

a. Différence de solubilité.

b. Différence de taille: les globules de protéine dénaturée (*cf.* Fig. 1C) présentent une taille très supérieure à ceux de la protéine fraîche (Fig. 1A); après régénération, les globules retrouvent leur taille primitive (Fig. 1D).

Par contre il ne semble pas que la basophile soit profondément modifiée. Pour ce qui concerne le Gram, les globules dénaturés continuent de prendre très vivement le Gram; il est d'ailleurs difficile de se prononcer sur une différence de degré dans la Gram-positivité puisque la méthode reste essentiellement qualitative: dans des essais préliminaires pour la rendre quantitative (étude du temps de décoloration en conditions standard), la Gram-positivité de la préparation dénaturée nous est apparue diminuée, mais ce résultat est encore trop incertain pour qu'on puisse faire fond sur lui. Par ailleurs, nous avons déjà signalé que les différences observées dans les spectres U.V. des préparations fraîche et dénaturée étaient d'interprétation difficile et pouvaient tenir uniquement à la plus grande concentration de soude nécessitée pour la mise en solution des préparations dénaturées; une fois régénérée et mise en solution en soude très diluée, la préparation P.R. montre d'ailleurs un spectre quelque peu différent de celui de la protéine fraîche (Fig. 4B).

En fait, il est très surprenant que la soude et la formamide connues pour être des dénaturants énergiques des protéines jouent ici un rôle opposé. Il s'agit certainement dans le cas présent d'un effet complexe qui mériterait à lui seul une étude approfondie. Notons toutefois que lorsque la solution alcaline est maintenue suffisamment longtemps, la régénération n'est plus possible: la neutralisation ne précipite plus qu'une fraction de la quantité mise en solution et cette fraction n'est plus soluble dans l'eau chaude.

2. Signalons enfin les résultats décevants obtenus lors d'une étude de détermination du poids moléculaire par la méthode de diffusion moléculaire. (PUTZEYS *et coll.*^{31, 32, 33})*.

Nous avons constaté, en effet, que la diffusion présentait dans certains cas une augmentation pour des concentrations diminuées: cette circonstance interdit donc de se fier aux valeurs de poids moléculaires apparents dont l'extrapolation aux dilutions infinies permet le calcul du poids moléculaire réel. Notons également que nous avons observé un accroissement de la diffusion d'une même solution en soude diluée après un certain temps de séjour: dans ce dernier cas il s'agit certainement d'un phénomène de dénaturation non réversible, très différent, bien entendu, du phénomène de régénération que la mise en solution suivie de reprécipitation à neutralité permet de réaliser. Cette interprétation est confirmée par le fait qu'après un tel séjour (6 à 7 heures) la neutralisation ne permet nullement d'obtenir une récupération quantitative de la protéine. Quant au phénomène d'augmentation de la diffusion avec la dilution, sa signification nous échappe et il peut être dû soit à un mécanisme de dénaturation, soit à un accroissement des fluctuations produites.

On voit, par ces différentes remarques, que les conditions particulières de dénaturation de cette protéine posent de nombreux et difficiles problèmes. Ajoutons par ailleurs, qu'il faut vraisemblablement tenir compte, pour saisir le comportement physico-chimique de cette substance, de la nature nettement acide de la protéine vis-à-vis de laquelle la dénaturation par les substances alcalines ne pourrait se produire qu'après

* Nous adressons au professeur PUTZEYS et au Dr LONTIE tous nos remerciements pour l'accueil si aimable qu'ils nous ont réservé.

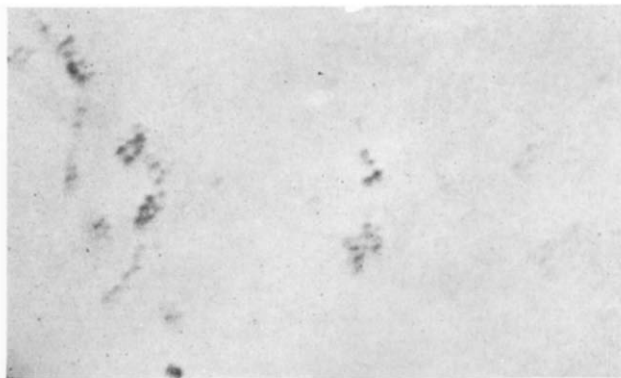
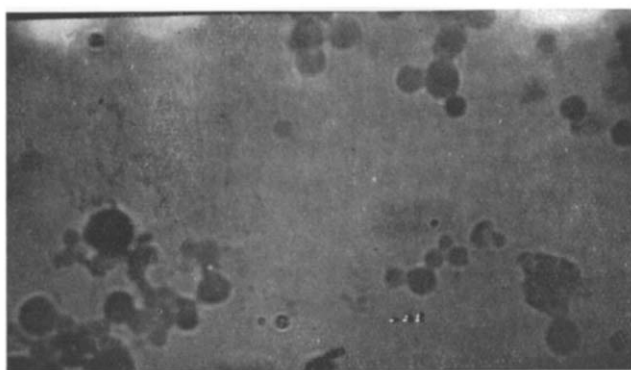


Fig. 6A. Protéine fraîche traitée par sels biliaires et devenue Gram-négative

Fig. 6B. Protéine dénaturée traitée par sels biliaires et devenue Gram-négative

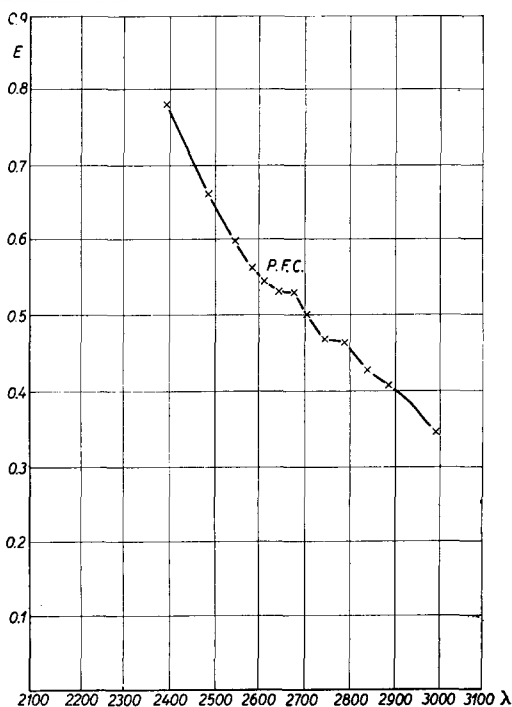


saturation des groupes carboxyles libres. Dans cette perspective, il y aurait au moins deux types de dénaturation possibles: l'un (notamment par vieillissement ou maintien prolongé en suspension aqueuse) entraînant la formation d'aggrégats dissociables par une quantité minima de soude (régénération après neutralisation), l'autre entraînant la formation d'aggrégats non dissociables dans les mêmes conditions et représentant une forme de dénaturation analogue à celle produite par la soude dans le cas des protéines du type globuline ou albumine.

B. Action des sels biliaires

Nous avons montré dans un travail antérieur²⁴ que le traitement par les sels biliaires d'un matériel fixé supprimait la colorabilité Gram tout en conservant la morphologie. Il est possible de vérifier qu'il en est de même sur la substance isolée fraîche et dénaturée (Fig. 6A et B). Ce traitement modifie profondément la structure de la protéine. On peut aisément s'en assurer en étudiant le spectre U.V. (Fig. 7). En effet, si l'on traite une suspension de 0.70 mg de protéine fraîche (P.F.) par 1 ml d'une solution de déhydrocholate de Na 4% pendant 1 heure à 50°, on obtient après centrifugation, un culot (composé des globules Gram-négatifs) et un surnageant. Le culot peut être remis en solution en soude N/20. On voit que le spectre obtenu

Fig. 7. Spectre de la protéine fraîche après traitement par sels biliaires



montre à la place des deux maxima à 2650 et 2800 Å deux paliers discrets (Courbe P.F.C.). Quant à la fraction détachée et soluble dans la solution de sels biliaries, elle est précipitable par l'alcool et en grande partie soluble dans l'eau froide, mais ne représente qu'un très faible pourcentage de la quantité de protéine mise en œuvre.

Ajoutons que les divers essais de combinaison de ribonucléate de Mg avec le culot ont échoué (essais entrepris en parallèle des expériences de replaquage du ribonucléate sur le complexe Gram isolé des bactéries par HENRY ET STACEY^{15, 16}).

V. DISCUSSION

1. Les résultats ci-dessus font apparaître la protéine étudiée comme une substance très particulière aux propriétés souvent déroutantes. Non seulement l'aspect globulaire sous lequel elle se présente *in vivo* et le vraisemblablement haut degré de pureté qu'elle y présente, mais sa composition, sa structure et ses propriétés physico-chimiques nous semblent ne pouvoir la classer dans aucune "catégorie" de protéines déjà connues. Vu l'intérêt biochimique de la question, nous nous sommes arrêtés, dans une série de travaux antérieurs²³⁻²⁶, à la nature de la propriété Gram présentée par cette substance. Nous avons proposé²⁶, en considération des résultats obtenus par HENRY ET STACEY¹⁶ et dont nous avons pu vérifier le bien fondé, de lier cette propriété à la présence de bases azotées au niveau desquelles s'effectuerait la synthèse d'acide ribonucléique, et non pas à la présence de ce dernier que nos recherches avaient démontré n'être pas nécessaire à la colorabilité Gram. Les renseignements complémentaires que nous venons d'obtenir nous porteraient à mettre en cause également la basophilie propre de la substance: en effet, le Gram comporte deux étapes, dont l'une est la fixation du colorant basique et l'autre son mordantage par l'iode; nos résultats nous amèneraient donc à envisager un mécanisme en deux temps: la première de ces deux étapes, qui constitue une condition préparatoire indispensable serait liée à la présence de groupements acides qui peuvent être, soit ceux de la molécule d'acide ribonucléique présente, soit ceux des acides aminés dicarboxyliques comme c'est le cas pour la protéine étudiée ici. Une telle conception fournirait une interprétation immédiate de résultats anciens de CHURCHMAN ET STEARN ET STEARN³⁶. La seconde étape, qui est absolument caractéristique de la réaction de Gram et qui comporte l'action de l'iode et celle du décolorant, relèverait des mécanismes que nous avons essayé d'analyser par ailleurs: combinaison chimique comportant l'action d'un oxydant doux entre le colorant basique déjà fixé par électro-valence (basophilie préparatoire) et d'autres groupements actifs de la protéine (rôle joué éventuellement par les bases azotées présentes).

2. Pour ce qui concerne la structure globulaire et les curieuses propriétés de solubilité de la substance, nous ne disposons d'aucun début d'explication chimique. A notre connaissance, seule la protéine M du groupe A des streptocoques hémolytiques de LANCEFIELD étudiée par ZITTLE⁴² présenterait des propriétés comparables. Nous nous réservons de revenir dans un mémoire ultérieur sur certaines propriétés de cette substance qui présente de curieuses analogies physico-chimiques avec la protéine étudiée ici. Signalons toutefois dès maintenant une différence importante de comportement: la protéine M se combine avec l'acide ribonucléique par liaison saline aux environs de pH 5, c'est-à-dire au dessous du p_H, dans la zone où la protéine est chargée positivement. La protéine que nous avons étudiée ici au contraire, quel que soit le pH des suspensions, ne se combine, ni à chaud, ni à froid, avec l'acide ribonucléique (ni avec le desoxyribo-).

Cette dernière observation nous ramène au problème qui a orienté nos recherches: comment et par quel mécanisme s'effectue la transformation de la substance qui se produit lors de la fécondation et aboutit à une synthèse massive de ribonucléoprotéines²². Nous avons montré avec PASTEELS²⁷ que celle-ci s'effectuait au niveau des fractions les plus légères du matériel cytoplasmique sédimentable (le "surnageant" de centrifugation) et que les nucléoprotéines ainsi produites étaient ensuite intégrées dans les granules plus complexes. De fait, aussi bien le caractère brusque de la synthèse envisagée que la perte du Gram lors de ces phénomènes indiquent qu'il ne s'agit pas d'une simple combinaison d'acide ribonucléique avec la protéine: celle-ci est profondément métabolisée, et nous savons désormais que la formation d'un nucléate de protéine est à exclure, et à plus

forte raison dans le milieu cellulaire dont le pH est à coup sur supérieur au pH_i de la protéine.

3. Ces observations nous ramènent à la conclusion que nous avons déjà formulée précédemment²⁶: la protéine du gamète mâle d'*Ascaris megaloccephala* constitue l'exemple d'un véritable vitellus exogène, qui, par des mécanismes différents de ceux relatifs aux vitellus d'oeufs mais présentant une signification biochimique très analogue, est intéressé au premier chef au métabolisme des nucléoprotéines lors du développement du gamète lui-même comme de l'embryon. Insistons en particulier sur le fait qu'au cours de la spermatogénèse la diminution de basophilie précédant l'élimination complète de la basophilie résiduelle, étudiée par PASTEELS²⁹ et nous même

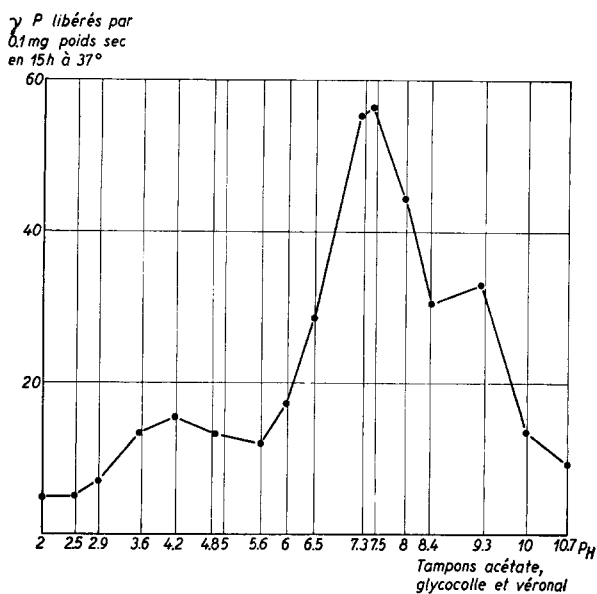


Fig. 8. Courbe d'activité phosphatasique en fonction du pH_i des gamètes mâles

(cas du "cytophore") n'est pas due à une simple "dilution" dans un cytoplasme plus abondant: celle-ci atteint plus de 50% du contenu primitif, comme on peut s'en assurer par extraction trichloracétique selon SCHNEIDER³⁴ et dosage selon DAVIDSON ET WAYMOUTH⁷. Il y a là un parallélisme étroit avec ce que BRACHET a vu dans les œufs d'Amphibiens² et que nous avons observé nous-même dans l'œuf d'*Ascaris*.

Un second fait qui permet de donner à l'élaboration de la protéine la signification d'une vitellogénèse a trait à la distribution de l'équipement phosphatasique au cours de la spermatogénèse. Les courbes des Fig. 8 à 10 résument les résultats de cette étude (substrat utilisé: β -glycérophosphate de Na). Le pH optimum est à 7.4 (Fig. 8), l'inactivation croît avec la température à partir de 40° (Fig. 9), l'action hydrolasique est terminée au bout de 10 h à 37° (Fig. 10). L'ion Mg a un effet activateur modéré (l'activité n'est que doublée); la durée de l'autolyse à 37° est sans influence notable, sauf au niveau des gonies où l'activité est accrue de 50% lorsque la durée d'autolyse passe de 3 à 8 heures. Le résultat essentiel est figuré dans la Fig. 11: on voit que l'activité phosphatasique décroît régulièrement au cours de la spermatogénèse; on retrouve donc là un résultat

analogue à celui rencontré dans l'étude de l'ovogénèse où l'activité phosphatasique décroît (tandis que par contre l'activité phosphoprotéine-phosphatasique liée essentiellement aux plaquettes vitellines croît au fur et à mesure de la vitellogénèse).

L'application de la méthode de GOMORI¹⁴ permet de voir que l'activité est concentrée dans le noyau. Signalons par ailleurs que les zones de transformation de la protéine manifestent dans l'œuf fécondé une faible activité, mais plus intense néanmoins que celle du cytoplasme ovulaire même.

On voit que ces différents résultats sont de nature à renforcer l'hypothèse précédemment avancée: certes, les conditions d'extraction utilisées interdisent jusqu'à présent d'examiner systématiquement si certaines activités enzymatiques ne seraient pas liées à la protéine, et il n'est pas exclu *a priori* qu'un rôle enzymatique

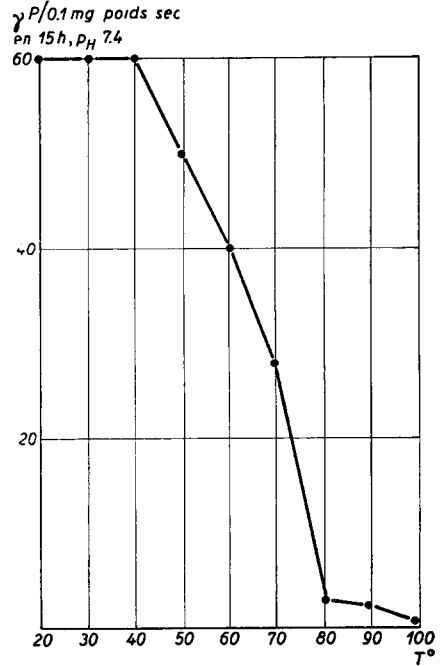


Fig. 9. Effets de la chaleur sur l'action phosphatasique des gamètes mâles

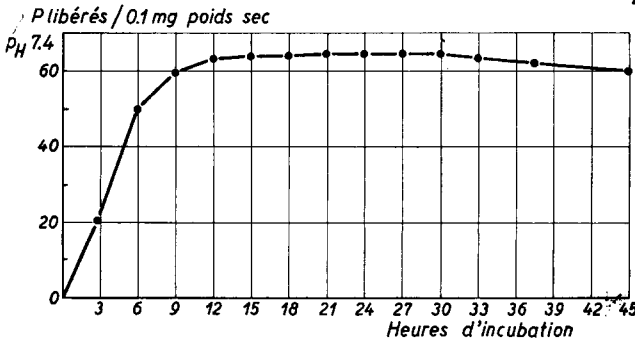


Fig. 10. Courbe d'activité phosphatasique des gamètes mâles en fonction du temps d'incubation

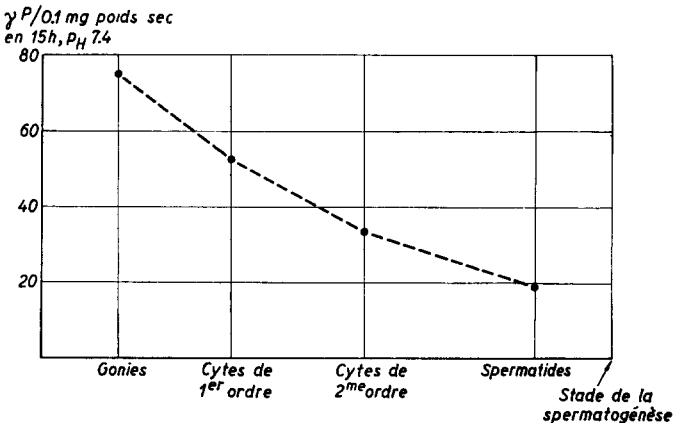


Fig. 11. Courbe d'activité phosphatasique des gamètes mâles en fonction du stade de spermatogénèse

mécanismes très différents; ceux-ci joueraient donc bien le rôle d'un vitellus, soit exogène comme c'est le cas pour la protéine étudiée ici, soit non-lié à une structure gamétique, comme ce serait le cas pour les complexes gram-positifs des bactéries.

Ce travail a été effectué en partie grâce à une bourse d'échange des chercheurs franco-belges attribuée par le C.N.R.S.

RÉSUMÉ

L'étude du complexe protéique caractéristique du gamète mâle d'*Ascaris megalocephala*, effectuée *in vitro* et *in vivo*, prouve qu'il ne s'agit pas d'une nucléoprotéine, mais bien d'une protéine acide à chiffre de N élevé riche en acide aspartique, liée à des groupements puriques et homogène à l'électrophorèse. L'étude spectrographique et physico-chimique permet de mettre en lumière certains phénomènes d'instabilité liés aux conditions de dénaturation et de régénération par les bases fortes. L'hypothèse selon laquelle cette protéine jouerait le rôle d'un vitellus exogène est envisagée.

SUMMARY

Study of the characteristic protein complex of the male gamete of *Ascaris megalocephala*, carried out *in vitro* and *in vivo*, proves that we have not to do with a nucleoprotein, but with an acid protein of high nitrogen content, rich in aspartic acid, linked to purine groups and homogeneous in the electrophoretic test. A spectrographic and physico-chemical study brings to light certain phenomena of instability connected with the conditions of denaturation and regeneration by strong alkalis. The hypothesis is considered according to which this protein would act as an exogeneous vitellus.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung, *in vitro* und *in vivo*, des charakteristischen Proteinkomplexes des männlichen Gameten von *Ascaris megalocephala* beweist, dass es sich hier nicht um ein Nukleoprotein handelt, sondern um ein saures, stickstoffreiches Protein, das reich an Asparaginsäure, durch Puringruppen gebunden und bei der Elektrophorese homogen ist. Mit Hilfe spektrographischer und physikalisch-chemischer Methoden wurden verschiedene Erscheinungen der Unbeständigkeit dieses Proteins aufgezeigt, welche von den Bedingungen der Denaturierung und Regenerierung durch starke Basen abhängen. Die Hypothese, wonach das beschriebene Protein als exogener Gelbpurper wirken würde, wurde erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 286.
- ² J. BRACHET, *Embryologie Chimique*, éd. Desoer, Liège, 1946.
- ³ G. CHAMPETIER ET E. FAURÉ-FREMIET, *Compt. rend.*, 204 (1937) 1901.
- ⁴ E. CHARGAFF, C. LEVIN ET C. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 67.
- ⁵ A. CLAUDE, *J. Exp. Med.*, 80 (1944) 19.
- ⁶ R. CONSDEN, A. A. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- ⁷ J. DAVIDSON ET C. WAYMOUTH, *Biochem. J.*, 38 (1944) 379.
- ⁸ C. E. DENT, *Biochem. J.*, 43 (1948) 169.
- ⁹ Z. DISCHE, *Mikrochemie*, 8 (1930) 4.
- ¹⁰ E. FAURÉ-FREMIET, *Arch. Anat. Micr.*, 15 IV (1913) 433.
- ¹¹ E. FAURÉ-FREMIET ET J. FILHOL, *J. Chim. Phys.*, 34 (1937) 444.
- ¹² J. FILHOL, *Arch. Anat. Micr.*, 33 (1937) 301.
- ¹³ O. FOLIN ET H. MALMROS, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 115.
- ¹⁴ G. GOMORI, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 37 (1941) 71.
- ¹⁵ H. HENRY ET M. STACEY, *Nature*, 151 (1943) 671.
- ¹⁶ H. HENRY ET M. STACEY, *Proc. Roy. Soc., London B.*, 133 (1946) 391.
- ¹⁷ R. D. HOTCHKISS, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 315.
- ¹⁸ A. E. MIRSKY ET A. W. POLLISTER, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1946) 117.
- ¹⁹ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.

- ²⁰ J. H. NORTHROP, *Crystalline Enzymes*, Columbia University Press, N. Y., 1948.
²¹ J. H. NORTHROP ET M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930) 781.
²² J. PANIJEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 1098.
²³ J. PANIJEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 116.
²⁴ J. PANIJEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 336.
²⁵ J. PANIJEL, *Compt. rend.*, 226 (1948) 1023.
²⁶ J. PANIJEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1949) 510.
²⁷ J. PANIJEL ET J. PASTEELS, à paraître.
²⁸ J. PASTEELS, *Experientia*, 4 (1948) 150.
²⁹ J. PASTEELS, *Arch. Biol. (Liège)*, 49, 4 (1948) 408.
³⁰ J. PASTEELS ET J. PANIJEL, à paraître.
³¹ P. PUTZEYS ET J. BROSTEAX, *Trans. Faraday Soc.*, 31 (1935) 1314.
³² P. PUTZEYS ET J. BROSTEAX, *Mededeel. Klasse Wetenschap Koninkl. Belg. Acad.*, 3 (1941) 1.
³³ P. PUTZEYS ET R. LONTIE, *Bull. soc. chim. biol.*, 28 (1946) 503.
³⁴ W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
³⁵ J. L. D. SHAW ET W. D. MACFARLANE, *Can. J. Research*, 16B. (1938) 368.
³⁶ A. E. STEARN ET E. W. STEARN, *J. Bact.*, 20 (1930) 287.
³⁷ P. K. STUMPF, *J. Biol. Chem.*, 169 (1947) 367.
³⁸ T. SVEDBERG ET B. SJÖGREN, *J. Am. Chem. Soc.*, 52 (1930) 279.
³⁹ R. VENDRELY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 95.
⁴⁰ E. VISCHER ET E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 715.
⁴¹ H. M. WINEGARD ET G. TOENIES, *Science*, 108 (1948) 506.
⁴² C. A. ZITTLE, *J. Immunol.*, 43 (1942) 31.

Reçu le 19 Septembre 1949