

ÉTUDES IMMUNOCHIMIQUES ET ÉLECTROPHORÉTIQUES DES GLOBULINES DU BLANC D'OEUF DE POULE

CARACTÉRISATION ET ESSAIS D'ISOLEMENT

par

MARIE KAMINSKI

Service de Chimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)

Au cours de nos études immunochimiques sur le Blanc d'Oeuf^{1,2}, nous avons remarqué la présence de constituants antigéniques non signalés jusqu'à présent, nettement distincts des quatre protéines qui ont été jusqu'à maintenant étudiées et caractérisées immunologiquement, à savoir, l'Ovalbumine, l'Ovomucoïde, la Conalbumine et le Lysozyme*. Ces constituants observés au moyen de la technique immunochimique de diffusion dans la gélose forment deux groupes: le premier se compose de 1 à 4 lignes de précipité spécifique voisines, migrant très lentement; on les observe par conséquent en retard par rapport aux autres lignes et toujours très proches du centre de diffusion de l'antigène. Le deuxième groupe, qui semble composé d'un seul constituant peut très facilement être confondu avec la ou les lignes de la Conalbumine, car lors de l'étude du Blanc d'Oeuf total, il migre à la même vitesse. La dilution ne les dissocie pas nettement et il faut pour pouvoir les distinguer, fractionner le Blanc d'Oeuf. Ces constituants se rencontrent en quantités appréciables dans les fractions du Blanc d'Oeuf précipitées à moins de 50% de saturation en sulfate d'ammonium.

Cet ensemble de faits (migration lente, solubilité faible dans le sulfate d'ammonium) nous a fait penser que ces constituants sont des Ovoglobulines. Les Ovoglobulines ont été les moins étudiées parmi les constituants du Blanc d'Oeuf. Elles en représentent de 6 à 8% par analyse chimique; par électrophorèse LONGSWORTH et coll.³ ont démontré l'existence de trois Ovoglobulines G₁, G₂, G₃ représentant au total environ 11% (ultérieurement G₁ fut identifié avec le Lysozyme). Ces auteurs prétendent obtenir G₂ qui est une euglobuline, à peu près pure et, d'autre part, un mélange de G₁ et G₃ ne contenant pas de G₂ (par extraction avec un tampon de pH 3.94).

Nous avons voulu, en réunissant les données expérimentales chimiques et physiques d'une part, et immunologiques de l'autre, étudier les Globulines de Blanc d'Oeuf et essayer de les isoler après les avoir caractérisées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Antigènes

Nous nous sommes servis de Blanc d'Oeuf de Poule entier, et de ses fractions purifiées:

Ovalbumine, cristallisée selon SØRENSEN; Ovomucoïde, fractionné suivant FRÉDÉRICQ ET DEUTSCH⁴; Conalbumine, préparée selon BAIN ET DEUTSCH⁵; Lysozyme cristallisé, de chez Armour et Cie (Chicago); et des diverses préparations d'Ovoglobulines suivantes:

* Une revue récente des propriétés chimiques et physiques des protéines du Blanc d'Oeuf par H. FEVOLD est publiée dans le volume 6 des *Advances in Protein Chemistry*.

Les Ovoglobulines brutes sont obtenues à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium (OGIT). Nous avons préparé les fractions globuliniques par diverses méthodes telles que: 1) dialyses contre le tampon à pH 3.95 ou eau bidistillée (suivant LONGSWORTH), 2) électrodialyse, 3) ultracentrifugation préparatoire, 4) électrophorèse—convection à pH 4,5) séparation électrophorétique dans l'appareil de Tiselius ou élution après électrophorèse sur papier. Ces diverses fractions ne se sont pas montrées homogènes, ni électrophorétiquement ni immunologiquement. De plus, le rendement fut mauvais car les mucines qui précipitent avec les globulines sont très difficiles à éliminer. Les techniques 2 et 3 présentent en plus l'inconvénient de dénaturer sensiblement le produit et la récupération est insuffisante.

Nous avons ensuite entrepris le fractionnement au sulfate d'ammonium et à partir de deux préparations d'Ovoglobulines brutes: (OGI (1) et OGI (3)) et de Blanc d'Oeuf total (Bl.O.N), nous avons préparé des fractions à 28 %: (OGI (3) 28 %), 28–36 %: (OGI (1) 36 % et OGI (3) 36 %), 36–50 %: (OGI (3) 50 %) et au delà de 50 % de saturation en sulfate d'ammonium: (OGI (3) > 50 %); ou de 0 à 40 % et au delà de 40 %: (OGI (3) 40 % et OGI (3) > 40 %).

Nous avons aussi préparé un Blanc d'Oeuf artificiel, incomplet (Bl.O.A.): reconstitution du Blanc d'oeuf à partir de ses fractions pures, sans globulines: 70 % d'Ovalbumine, 15 % de Conalbumine, 10 % d'Ovomucoïde et 5 % de Lysozyme.

Anticorps

Les antisérums de lapin ont été déjà décrits^{1,2}. Ce sont des sérums: anti-Blanc d'Oeuf total (A B O), anti-Ovoglobulines brutes (AOGI) et comme référence les sérums anti-Ovalbumine (AOV) et anti-Conalbumine (ACA).

Le sérum anti-Ovoglobulines a été d'autre part épuisé par l'Ovalbumine (AOGI-OV) avec 2 mg OV/ml sérum et par la Conalbumine: avec 800 γ et 2 mg d'azote de Conalbumine par ml de sérum (AOGI-CA).

Techniques

Nous nous sommes servis des méthodes suivantes:

1. Electrophorèse selon TISELIUS ainsi que sur papier et sur gélose; 2. Ultracentrifugation analytique; 3. Pression osmotique; 4. Techniques immunologiques: a. précipitation spécifique quantitative selon HEIDELBERGER ET KENDALL⁶; b. précipitation spécifique dans la gélose.

Nous avons modifié la technique primitive^{1,7} selon Ouchterlony consistant en la diffusion libre de deux réactifs dans une boîte de Pétri, de la façon suivante: Nous avons découpé dans une couche de gélose coulée sur une plaque de verre des bassins rectangulaires longs et étroits, disposés parallèlement, destinés aux différentes préparations antigéniques et des bassins plus larges disposés, soit au centre, soit au bord de la plaque destinés au mélange de gélose et de l'antisérum (dilué au $\frac{1}{4}$ environ). Ce dispositif présente plusieurs avantages: une dispersion moins grande des réactifs, une meilleure localisation des lignes du précipité, ce qui facilite les comparaisons et les identifications qui sont l'intérêt majeur de la méthode. On réalise enfin ainsi les conditions les plus proches de l'excès permanent de l'antigène, ce qui permet, du point de vue théorique de supposer constante la concentration en antigène.

En laissant environ 5 mm d'espace entre les bassins d'antigène (liquide) et du mélange d'antisérum et de gélose, et en mettant l'antigène en même temps que l'antisérum, on peut admettre que seuls les constituants antigéniques lourds, à très petite constante de diffusion formeront un précipité spécifique dans la gélose pure, tous les autres diffuseront peu à peu, plus ou moins vite dans la zone d'antisérum et c'est là que les lignes se formeront et se déplaceront. On sait que deux facteurs jouent dans la prévision de l'endroit de formation de la ligne: le rapport des concentrations des deux réactifs et leurs constantes de diffusion. (Si les concentrations sont équivalentes, l'endroit de formation de la ligne ne dépend que du rapport des constantes de diffusion). D'autre part, si les deux constituants d'un mélange d'antigènes diffusent ensemble et les deux lignes de précipité se confondent, il est possible de les différencier en changeant leurs concentrations respectives, c'est-à-dire en enrichissant ou en appauvrissant le mélange en un constituant donné^{7,13}.

De plus, le fait de l'immobilisation relative des anticorps par leur incorporation dans le gel facilite à la longue une différenciation fine des antigènes dont les constantes de diffusion sont voisines. Au début de la diffusion certains groupes d'antigène migrent ensemble, mais au fur et à mesure que la diffusion se poursuit, les petites différences commencent à jouer et les lignes se séparent.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Electrophorèse

Electrophorèse dans l'appareil de TISELIUS

(mêmes conditions opératoires que dans nos études précédentes (2))

Les tracés électrophorétiques (Fig. 1) montrent qu'à l'opposé des Ovoglobulines

brutes qui sont peu modifiées par rapport au Blanc d'Oeuf initial, les fractions entre 30 et 40% de saturation en sulfate d'ammonium sont considérablement enrichies en globulines et que la quantité d'Ovalbumine est sensiblement diminuée. Les fractions au delà de 40% de saturation en sulfate d'ammonium ne contiennent presque plus de globulines. Le diagramme du Blanc d'Oeuf artificiel incomplet correspond presque entièrement à la fraction du Blanc d'Oeuf au delà de 50% de saturation en sulfate d'ammonium. Ce fractionnement assez sommaire n'est pas

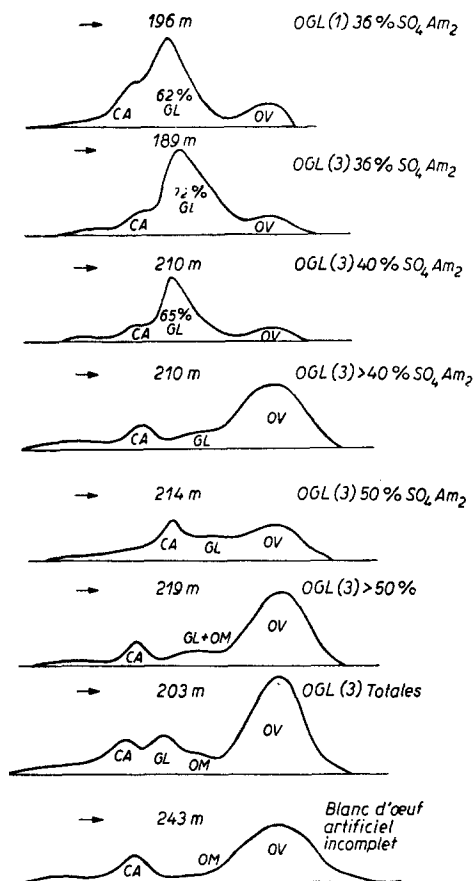


Fig. 1. Tracés électrophorétiques des différentes préparations d'Ovoglobulines et du Blanc d'Oeuf artificiel (frontière descendante, temps indiqué en minutes) tampon phosphate pH 7.6; force ionique 0.2, isotonique.

sulfate d'ammonium) on voit nettement des bandes correspondant à l'Ovalbumine, aux Globulines et à la Conalbumine (ces 2 dernières non séparées), alors que la bande médiane correspondant aux Globulines, disparaît dans les préparations au delà de 40 ou 50% de saturation en sulfate d'ammonium (Fig. 2). Après l'électrophorèse, nous avons élué ces bandes et nous avons employé les solutions obtenues comme antigènes dans les plaques de gélose. Les fractions analysées ainsi se sont rarement révélées pures, mise à part l'Ovalbumine qui migre la première; les bandes suivantes contiennent un mélange de Conalbumine et de Globulines.

Electrophorèse sur gélose⁹

Par cette méthode qui associe la migration électrophorétique et la précipitation

est sensiblement diminuée. Les fractions au delà de 40% de saturation en sulfate d'ammonium ne contiennent presque plus de globulines. Le diagramme du Blanc d'Oeuf artificiel incomplet correspond presque entièrement à la fraction du Blanc d'Oeuf au delà de 50% de saturation en sulfate d'ammonium. Ce fractionnement assez sommaire n'est pas suffisant pour éliminer la Conalbumine. Le même phénomène est rapporté par FORSYTHE ET FOSTER⁸ lors du fractionnement de Blanc d'Oeuf par l'éthanol: la Conalbumine est très difficile à séparer des Globulines. Nous avons observé le même fait à l'électrodialyse, où les fractions insolubles contenaient une forte proportion de Conalbumine. Il faut en rapprocher ce qui se passe lors de la diffusion dans la gélose où une partie des Globulines accompagne la Conalbumine, ce qui peut suggérer même l'existence de complexes au sein du Blanc d'Oeuf. Le tracé de la courbe d'électrophorèse correspondant aux Globulines n'est pas gaussien. Ce constituant n'est donc pas homogène, mais nous ne pouvons pas encore déterminer de combien de Globulines il se compose, ni définir nettement leurs mobilités. Il peut s'agir de complexes partiellement décomposés, dont les constituants ne sont pas entièrement libres.

Electrophorèse sur papier

Dans le cas des fractions riches en globulines (28 à 36 ou 40% de saturation en

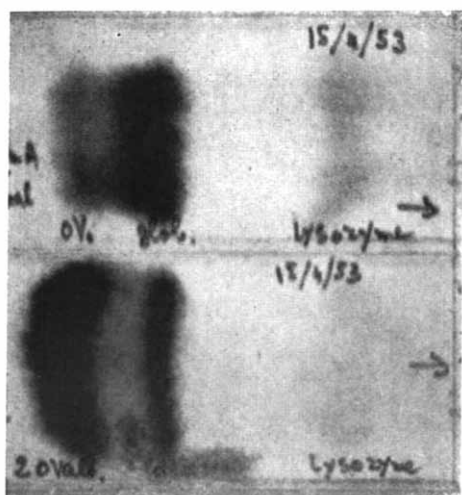


Fig. 2. Electrophorèse sur papier de deux préparations d'Ovoglobulines: OGI 40 % et OGI > 40 % (tampon véronal pH 8.3, force ionique 0.1).

spécifique, on différencie les globulines bien plus nettement que par l'électrophorèse seule. Des expériences sur plusieurs fractions de Blanc d'Oeuf, de même que sur le Blanc d'Oeuf total, montrent clairement l'existence de deux groupes d'Ovoglobulines, dont les mobilités électrophorétiques sont très voisines, mais qui, par contre, diffusent d'une manière très différente. Après la "révélation" avec un antisérum approprié, on constate que les lignes des globulines (Gl et α) se trouvent bien entre celle de l'Ovalbumine et celles de la Conalbumine, mais l'une d'elles (en fait souvent un groupe de lignes) se trouve tout près du centre de diffusion (Fig. 3).

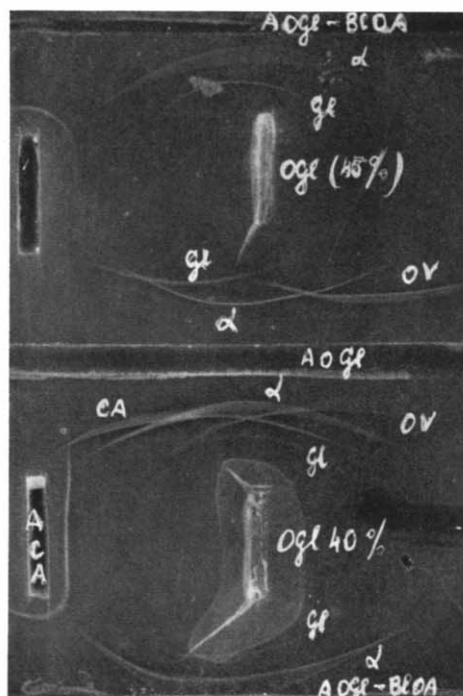
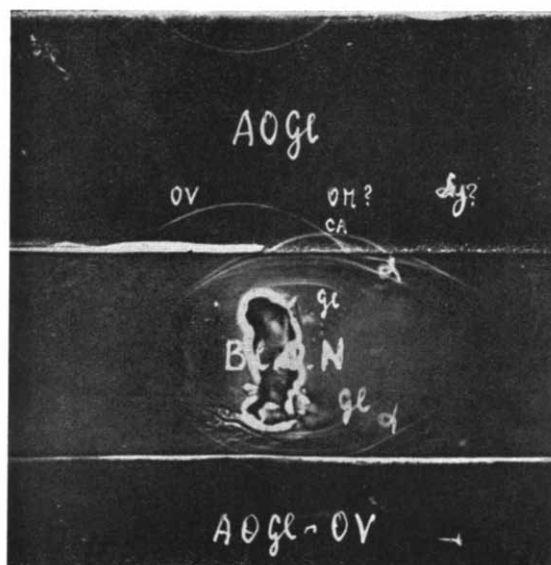


Fig. 3a et 3b. Electrophorèses sur gélose du Blanc d'Oeuf total et des fractions d'Ovoglobulines. Les lignes des Globulines sont marquées α et Gl, l'Ovalbumine OV, la Conalbumine CA. Dans la Fig. 3a la bande du haut est un mélange de gélose et de sérum AOgl, en bas gélose et le même sérum épuisé par l'Ovalbumine. Dans la Fig. 3b les sérums (anti-Ovoglobulines total et épuisé par le Blanc d'Oeuf artificiel) sont disposés dans les rainures en haut, au milieu et en bas de la plaque. La dénomination Gl (Fig. 3b en haut) se rapporte à une ligne peu visible; la ligne visible est celle de la conalbumine (CA). Dans la Fig. 3a en bas la ligne CA est peu visible.

*Analyse immunochimique**Précipitation spécifique quantitative*

La comparaison entre les courbes de précipitation du Blanc d'Oeuf, des Ovoglobulines brutes (solution qui a servi à l'immunisation des animaux) et de différentes

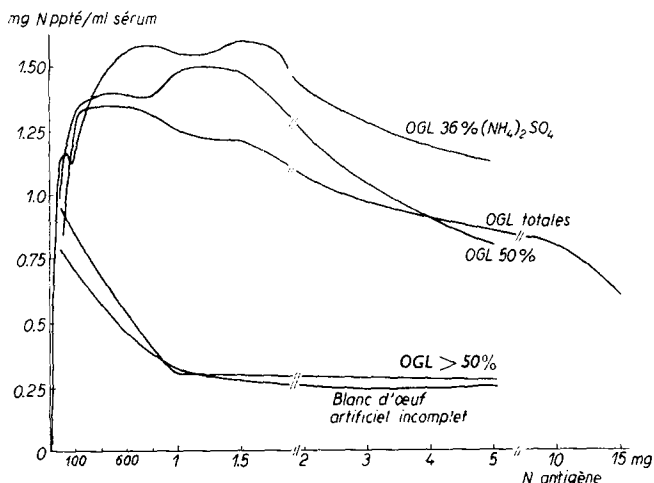


Fig. 4. Courbes de précipitation spécifique quantitative du sérum anti-Ovoglobulines. Antigènes: Ovoglobulines (OGL 36 %, OGL 50 %, OGL > 50 %, OGIT) et Blanc d'Oeuf artificiel.

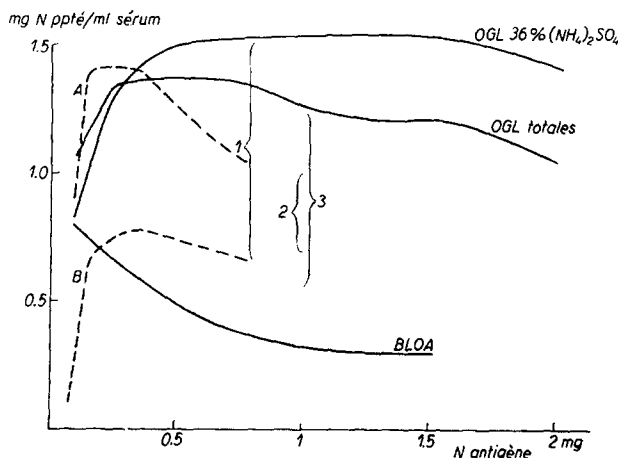


Fig. 5. Comparaison de taux d'azote précipité par les Ovoglobulines OGL 36 %, OGL 40 %, OGIT et Bl.O.A. avec le sérum AOGI total et épuisé par le Bl.O.A. La courbe A est une reconstruction du système précipitant OGL 40 % et AOGI. la courbe B correspond au système OGL 40 % + AOGI épuisé par Bl.O.A.

fractions et préparations globuliniques montre nettement l'existence dans le Blanc d'Oeuf de constituants très antigéniques autres que l'Ovalbumine, la Conalbumine, l'Ovomucoïde et le Lysozyme (Fig. 4) (ce fait a déjà été signalé^{1, 10} mais les auteurs américains n'ont pas envisagé que ces constituants puissent être des Globulines). Il est à remarquer la grande similitude des courbes du Blanc d'Oeuf artificiel et des fractions précipitées au delà de 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. C'est la fraction OGL

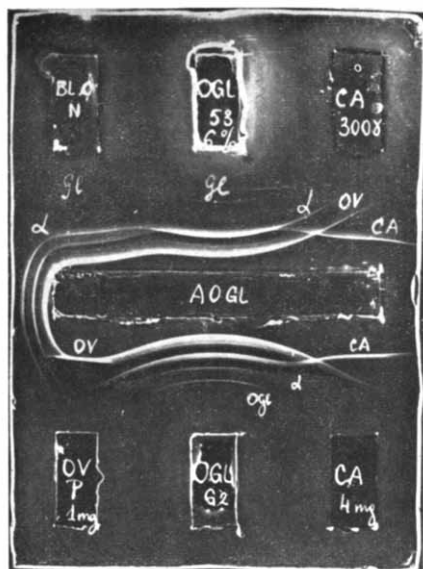


Fig. 6. Plaque de gélose. Comparaison de divers antigènes: Blanc d'oeuf total, Ovoglobulines brutes, Conalbumine (à deux concentrations différentes), Ovalbumine et la préparation d'Ovoglobulines G_2 .

mentée par ce premier fractionnement. Dans la préparation G_2 (suivant LONGSWORTH) il y a par contre peu de ce constituant. Les lignes restant près des bassins d'antigène correspondent à des Globulines de P.M. probablement plus élevé, leur constante de diffusion étant beaucoup plus petite que celle des autres constituants. La teneur des différentes préparations en ces constituants est sensiblement la même.

Les 4 figures suivantes (Fig. 7) montrent la composition de quelques fractions globuliniques comparées à l'Ovalbumine, la Conalbumine, le Blanc d'Oeuf total et les Ovoglobulines brutes par rapport à l'anti-sérum AOGL total et épuisé. (Ces réactions sont faites dans les boîtes de Pétri.) Dans la deuxième boîte on

36% qui s'avère la plus riche en antigènes globuliniques L'épuisement du sérum par le Blanc d'Oeuf artificiel enlève moins de la moitié des anticorps totaux (Fig. 5, courbe Bl OA).

La comparaison des taux de précipitation du Blanc d'Oeuf normal, des Ovoglobulines brutes et des Ovoglobulines 36 et 40% avec le sérum anti-Ovoglobulines total et épuisé par le Blanc d'Oeuf artificiel montre que la différence entre les deux points est la plus petite dans le cas du BL.O.N. Fig. 5 { 2 et la plus grande pour la fraction "Ovoglobulines" Fig. 5 { 1 et { 3, ce qui confirme une fois de plus la teneur élevée en Globulines de celle-ci.

Précipitation en milieu gélifié

La distinction entre le BL.O.N. et les Ovoglobulines brutes est bien visible sur la plaque (Fig. 6). On voit le constituant marqué α^* qui est en troisième position dans le Blanc d'Oeuf rejoindre la Conalbumine dans la préparation d'Ovoglobulines brutes, la proportion de ce constituant est donc déjà considérablement aug-

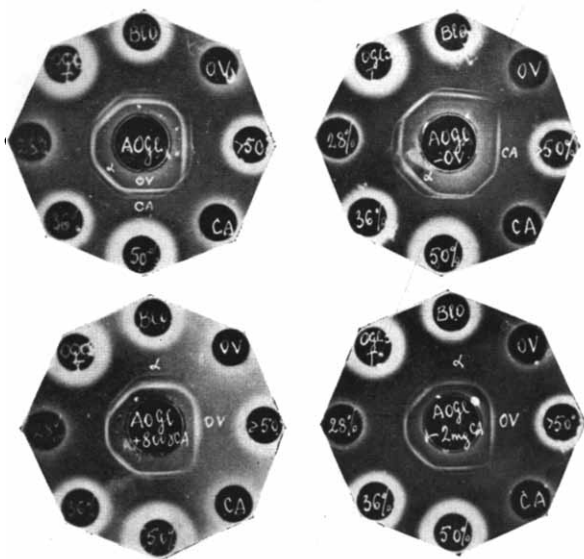


Fig. 7. Comparaison, en boîtes de Pétri, de diverses préparations d'Ovoglobulines et d'Ovalbumine, de la Conalbumine et de Blanc d'Oeuf total avec le sérum anti-Ovoglobulines total et épuisé par l'Ovalbumine et la Conalbumine.

* La dénomination α du constituant décelé par des méthodes immunochimiques ne préjuge pas de son analogie avec l' α -globuline du sérum.

voit la disparition de la ligne de l'Ovalbumine et dans les troisième et quatrième la disparition de celle de la Conalbumine.

C'est la fraction OGI 36% qui est la plus riche en constituant α dont la ligne migre même au delà de celle de l'Ovalbumine. La fraction OGI > 50% n'en contient plus.

Ces résultats confirment bien ceux obtenus par la précipitation spécifique quantitative.

Sur la photo de la plaque suivante (Fig. 8) où l'antisérum est incorporé dans la gélose, on voit une comparaison du Blanc d'Oeuf entier, artificiel et de deux fractions globuliniques contenant des proportions différentes du constituant α . La ligne de celui-ci croise celle de la Conalbumine pour passer de la troisième position dans le Blanc d'Oeuf en deuxième position dans les Ovoglobulines. Ce constituant α , de même que les Ovoglobulines lourdes (jusqu'à 4 lignes), ne se retrouve pas dans le Blanc d'Oeuf artificiel et ne correspond donc à aucune des quatre protéines qui composent celui-ci.

Ultracentrifugation et pression osmotique

L'étude de la sédimentation de la préparation d'Ovoglobulines OGI 40% montre l'existence de deux constituants: un, qui représente environ 85 à 90% de cette préparation, possède une constante de sédimentation de 3.6 (celle de l'Ovalbumine est de 3.55) et un deuxième, très lourd, dont la constante de sédimentation est de 16.3.

Le premier constituant correspond vraisemblablement à un mélange de protéines de faible et moyen poids moléculaire (lors des ultracentrifugations du Blanc d'Oeuf entier, YOUNG¹² et rev. de H. FEVOLD dans *Advances in Protein Chem.* n'a observé qu'une seule frontière).

D'autre part, les mesures de pression osmotique effectuées sur la même fraction OGI 40%, confirment ce résultat en donnant une moyenne de poids moléculaire d'environ 50,000, moyenne qui se situe entre l'Ovalbumine (40,000) et la Conalbumine (80,000) et en supposant les deux constituants de faible poids moléculaire (Ovomucoïde et Lysozyme) équilibrés par des constituants plus lourds présents en petites quantités.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

De l'ensemble des résultats rapportés ici, se dégagent en faveur de la nature globulinique des constituants que nous avons étudiés les arguments suivants:

- Le taux de sulfate d'ammonium utilisé pour leur précipitation
- Leur mobilité électrophorétique

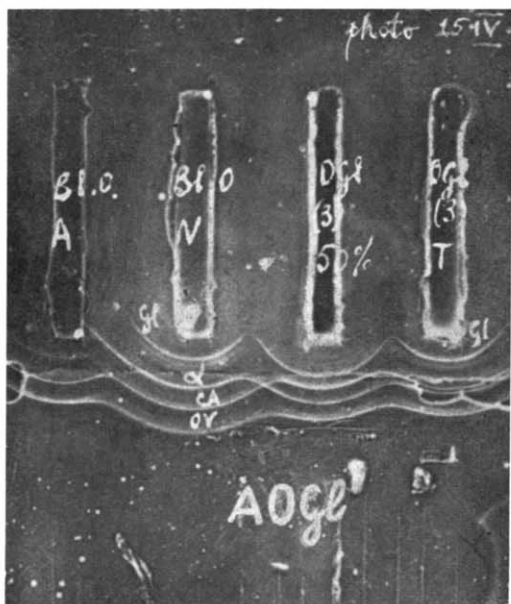


Fig. 8. Plaque de gélose. Le sérum anti-Ovoglobulines est incorporé à la gélose à la partie inférieure de la plaque. Comparaison de Blanc d'Oeuf total, artificiel et de deux préparations d'Ovoglobulines.

- Leur faible diffusion dans la gélose
- Leur constante de sédimentation élevée

En ce qui concerne cette dernière, on peut penser qu'elle correspond à un constituant de poids moléculaire élevé; il est peu probable qu'il s'agisse de l'Ovomucine. Celle-ci, qui est assimilée au facteur inhibiteur d'hémagglutination de LANNI¹¹ aurait, suivant cet auteur, une constante de sédimentation se situant entre 31 et 375. D'autre part, au cours du fractionnement, on se débarrasse progressivement des mucines, et il est très peu probable qu'on puisse en trouver jusqu'à 10 ou 12%, comme c'est le cas du constituant lourd de la fraction OGI 40%. Par contre la préparation de Lanni étudiée à l'électrophorèse révèle trois constituants ayant des mobilités respectives — 3.5, — 6.6 et — 10 dans le tampon phosphate pH 7.2. Le premier de ces trois est inactif. Sa mobilité correspond assez bien à celle des Globulines du Blanc d'Oeuf. On peut donc supposer que la préparation de LANNI contient, comme impureté, des Ovoglobulines.

Les Ovoglobulines étudiées ne peuvent pas non plus être confondues avec l'avidine. Celle-ci en effet, est soluble à 50% de saturation en sulfate d'ammonium et ne précipite que près de la saturation.

Nous tenons à remercier vivement Monsieur GRABAR de l'aide précieuse qu'il nous a apportée au cours de ce travail. L'ultracentrifugation a été effectuée par le Dr SLIZEWICZ du Service des Virus de l'Institut Pasteur que nous remercions de même que Mlle G. CHRISTOL qui a effectué les électrophorèses.

RÉSUMÉ

Nous avons, à l'aide des techniques électrophorétiques et immunochimiques étudié le Blanc d'Oeuf et certaines de ses fractions de relargage. Nous avons pu montrer ainsi l'existence de deux groupes de constituants fortement antigéniques différents de l'Ovalbumine, de la Conalbumine, de l'Ovomucoïde et du Lysozyme et nous avons pu préciser leur nature globulinique.

SUMMARY

With the aid of electrophoretic and immunochemical techniques, we have studied egg white and some of its salted-out fractions. We have thus been able to demonstrate the existence of two groups of strongly antigenic constituents differing from ovalbumin, conalbumin, ovomucoid and lysozyme, and we have determined their globulinic nature.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben mit Hilfe von elektrophoretischen und immunochemischen Methoden Hühnereiweiss und gewisse seiner durch Aussalzen erhaltenen Fraktionen untersucht. Wir haben so die Gegenwart von zwei Gruppen von Bestandteilen zeigen können, die sich stark antigenisch von Ovalbumin, Conalbumin, Ovomucoïd und Lysozym unterscheiden, und haben ihre Globulinnatur genau bestimmen können.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. KAMINSKI ET O. OUCHTERLONY, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 758.
- ² M. KAMINSKI ET J. NOUVEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 11.
- ³ L. G. LONGSWORTH, R. K. CANNAN ET D. A. MAC INNES, *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (1940).
- ⁴ J. A. BAIN ET H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 547.
- ⁵ E. FRÉDÉRICQ ET H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 499.
- ⁶ M. HEIDELBERGER ET F. E. KENDALL, *J. Exptl. Med.*, 62 (1935) 467.
- ⁷ O. OUCHTERLONY, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 32 (1953) 231.
- ⁸ R. H. FORSYTHE ET J. F. FOSTER, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 377 et 385.
- ⁹ P. GRABAR ET C. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- ¹⁰ L. R. WETTER, M. COHN ET H. F. DEUTSCH, *J. Immunol.*, 69 (1952) 109.
- ¹¹ F. LANNI dans H. FEVOLD, *Advances in Protein Chem.*, 6 (1951).
- ¹² E. YOUNG, *Nature*, 145 (1940) 1021.
- ¹³ M. KAMINSKI, *Bull. soc. chim. biol.* (à paraître).

Reçu le 27 juillet 1953