

- <sup>4</sup> E. L. HESS AND H. D. SLADE, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 346.
- <sup>5</sup> E. CHARGAFF, in E. CHARGAFF AND J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 330.
- <sup>6</sup> E. F. GALE AND J. P. FOLKES, *Biochem. J.*, 53 (1953) 493.
- <sup>7</sup> C. L. WISSEMAN, JR., J. E. SMADEL, F. E. HAHN AND H. E. HOPPS, *J. Bacteriol.*, 67 (1954) 662.
- <sup>8</sup> A. B. PARDEE, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 40 (1954) 263.
- <sup>9</sup> A. D. HERSHEY AND M. CHASE, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 39.
- <sup>10</sup> H. MCILWAIN, *J. Gen. Microbiol.*, 2 (1948) 288.
- <sup>11</sup> H. MICKLE, *J. Roy. Microscop. Soc.*, 68 (1948) 10.
- <sup>12</sup> K. PAIGEN, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 284.
- <sup>13</sup> H. G. KUNKEL AND A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1951) 89.
- <sup>14</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR AND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- <sup>15</sup> W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
- <sup>16</sup> G. CERIOTTI, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 297.
- <sup>17</sup> D. E. METZLER AND E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 363.
- <sup>18</sup> A. D. HERSHEY, J. DIXON AND M. CHASE, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1953) 777.
- <sup>19</sup> A. M. CRESTFIELD, K. C. SMITH AND F. W. ALLEN, *J. Biol. Chem.*, 216 (1955) 185.
- <sup>20</sup> R. SIGNER AND H. SCHWANDER, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 853.
- <sup>21</sup> G. H. LATHE AND C. R. L. RUTHVEN, *Biochem. J.*, 60 (1955) xxxiv.
- <sup>22</sup> A. R. PEACOCKE AND H. K. SCHACHMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 198.
- <sup>23</sup> E. G. PICKELS, W. F. HARRINGTON AND H. K. SCHACHMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 38 (1952) 943.
- <sup>24</sup> R. JEENER, *Nature*, 163 (1949) 837.
- <sup>25</sup> V. ALLFREY, M. M. DALY AND A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 37 (1953) 157.
- <sup>26</sup> M. FLEMING AND D. O. JORDAN, *Discussions Faraday Soc.*, 13 (1953) 217.
- <sup>27</sup> A. KLECZKOWSKI, *Biochem. J.*, 40 (1946) 677.
- <sup>28</sup> B. ROTMAN AND S. SPIEGELMAN, *J. Bacteriol.*, 68 (1954) 419.
- <sup>29</sup> A. B. PARDEE AND L. S. PRESTIDGE, *J. Bacteriol.*, 71 (1956) 677.
- <sup>30</sup> A. B. PARDEE, unpublished data.

Received May 9th, 1956

## PURIFICATION DE L'OVOMUCOÏDE PAR ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE

MARIAN JUTISZ, MARIE KAMINSKI ET JEAN LEGAULT-DÉMARE

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris, et Service de Chimie Microbienne  
de l'Institut Pasteur, Paris (France)*

Deux méthodes permettent actuellement la préparation de l'ovomucoïde biologiquement actif à l'état de pureté très avancée: l'une est due à LINEWEAVER ET MURRAY<sup>1</sup>, l'autre à FREDERICQ ET DEUTSCH<sup>2</sup>. Ces méthodes consistent l'une et l'autre en l'élimination des protéines étrangères accompagnant l'ovomucoïde dans le blanc d'oeuf par précipitation à pH 3,5 en présence d'acide trichloracétique.

LINEWEAVER ET MURRAY<sup>1</sup>, puis FREDERICQ ET DEUTSCH<sup>2</sup> avaient déjà remarqué l'hétérogénéité à l'électrophorèse de leurs préparations. BIER et coll.<sup>3</sup> ont repris plus tard l'étude électrophorétique détaillée de ces deux préparations d'ovomucoïde, et sont arrivés à la conclusion que ce que l'on considère en général comme l'ovomucoïde, serait en fait un complexe de protéines très semblables, et dont les différents constituants, tous doués d'activité antitrypsique, ne présenteraient entre eux qu'une faible différence, d'un groupe chargé en plus ou en moins par exemple.

*Bibliographie p. 180.*

Il nous a paru essentiel, avant d'aborder l'étude de la structure chimique de l'ovomucoïde en relation avec son activité antitrypsique, de contrôler l'homogénéité des préparations précédentes, et, si possible, d'en parfaire la purification. Les méthodes que nous avons utilisées dans ce but se rattachent à l'électrophorèse de zone; elles nous ont permis de constater dans les échantillons d'ovomucoïde préparés dans différents laboratoires et par nous-mêmes suivant les deux méthodes citées ci-dessus, la présence, selon les cas, de deux ou plusieurs constituants, dont seulement un seul est doué d'activité antitrypsique. Nous proposons ici une méthode de purification par électrophorèse de zone en colonne, permettant de traiter au départ de 300 à 500 mg d'ovomucoïde.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### Matériel

Les préparations suivantes d'ovomucoïde ont été utilisées:

(1) Préparation selon LINEWEAVER ET MURRAY<sup>1</sup>: HF-préparation fournie par le Dr. FRAENKEL-CONRAT, MJ-préparation obtenue dans ce laboratoire.

(2) Préparation selon FREDERICQ ET DEUTSCH<sup>2</sup>: LG-préparation obtenue au laboratoire par L. GORINI et constituée par la fraction II B, suivant le protocole de la méthode, MK-préparation obtenue par l'un de nous, (MK), mais non fractionnée par l'alcool (fraction II).

La trypsine cristallisée Worthington (USA), contenant 50 % de  $MgSO_4$  a été utilisée. Les concentrations indiquées en trypsine correspondent à la protéine pure.

La sérumalbumine est la fraction V selon COHN ET EDSAL<sup>4</sup> du plasma de boeuf (Armour, Chicago, USA).

### Techniques

*Electrophorèse sur papier.* Cette électrophorèse est faite selon les indications de MARKHAM ET SMITH<sup>5</sup>, sur papier Whatman 3.

*Electrophorèse sur gélose.* On utilise la technique d'URIEL ET SCHEIDEGGER<sup>6</sup> modifiée par URIEL ET GRABAR<sup>7</sup>.

*Immunoélectrophorèse.* La technique est celle de GRABAR ET WILLIAMS<sup>8</sup>. Sur une plaque de  $13 \times 18$  cm, on compare simultanément quatre préparations antigéniques; elles sont révélées, soit par deux bandes latérales d'un même antiserum, soit par quatre bandes dans le cas de deux antisérums différents.

Les antigènes sont employés à la concentration de 2 %, 0.15 ml par analyse; le sérum est mélangé à la gélose.

*Electrophorèse sur colonne de cellulose.* La technique utilisée dans ce travail est celle de FLODIN ET PORATH<sup>9</sup> dans sa modification récente<sup>10</sup>.

La poudre de cellulose est préparée selon les indications des auteurs, à partir de 200 g de coton hydrophile pharmaceutique. La quantité de support ainsi obtenue est suffisante pour le remplissage d'une colonne. La colonne utilisée pour l'électrophorèse consiste en un tube de pyrex de 35 mm de diamètre et de 600 mm de longueur; elle est remplie avec le support sur une hauteur de 500 mm.

*Elution.* A la fin de l'électrophorèse, la colonne est installée sur un collecteur de fractions, et on élue les protéines par le tampon ayant servi pour l'électrophorèse, à la cadence de 30 ml par heure, en recueillant des fractions de 4 ml.

Après le lavage au tampon, à la soude 0.01 N, à l'eau et de nouveau au tampon, la même colonne ressort pour d'autres électrophorèses.

Les fractions de 4 ml ainsi recueillies sont analysées pour leur contenu en protéines par absorption à 280 m $\mu$  dans un photomètre Beckman, modèle DU.

*Détermination de l'activité antitrypsique.* Cette détermination est faite par la technique de GORINI ET AUDRAIN<sup>11</sup>. Les conditions initiales ont été légèrement modifiées pour pouvoir doser de faibles quantités d'inhibiteur.

On réalise à 0° un mélange de 2 ml d'une solution de trypsine à 40  $\mu$ g/ml dans un tampon

borate 0.05 *M*; pH 7.9;  $10^{-2}$  *M* CaCl<sub>2</sub> et de 2 ml d'une solution d'ovomucoïde dans le même tampon. On ajoute 2.5 ml de ce mélange à 12.5 ml d'une solution de sérum-albumine préparée selon les indications des auteurs<sup>11</sup> et l'on porte au bain-marie à 37°. Des prélèvements de 3 ml sont faits à intervalles réguliers de 0 à 24 minutes (1 minute, 8, 16 et 24 minutes) et versés dans 5 ml d'une solution à 5% d'acide trichloracétique. Après 24 h de repos et centrifugation, on lit au spectrophotomètre à 280 mμ l'absorption du surnageant.

On construit des droites dont les pentes sont représentatives de la vitesse d'hydrolyse du substrat, cette vitesse étant inversement proportionnelle à la quantité d'inhibiteur ajouté. Il est possible d'interpoler dans les limites de 0 à 80% d'inhibition.

*Définition de l'unité antitrypsique.* Nous définissons ici l'unité d'action antitrypsique en prenant comme standard la trypsine Worthington cristallisée: une unité antitrypsique correspond à la quantité d'ovomucoïde qui, dans les conditions du dosage définies ci-dessus, diminue de 50% la vitesse d'hydrolyse du substrat par 50 μg de cette trypsine.

## RÉSULTATS

### *Electrophorèse sur papier*

Les conditions suivantes ont été utilisées: tampon Véronal sodique 0.1 *M*; pH 8.2; durée 6 heures; 6.5 V/cm. Dans une autre expérience on a employé le tampon acétate de sodium 0.1 *M*; pH 4.6; durée 14 h 30. La révélation est faite au bleu de bromophénol.

Une électrophorèse préparative sur trois bandes de papier nous a permis, en partant de 20 mg d'une préparation d'ovomucoïde, d'obtenir après l'élution des bandelettes contenant les produits séparés, des quantités de protéines suffisantes pour pouvoir doser l'azote et l'activité.

Trois préparations ont été examinées: HF, MJ et LG. Dans tous les cas on a constaté la présence d'au moins deux constituants réagissant au bleu de bromophénol: l'un migrant vers l'anode, l'autre se déplaçant légèrement vers la cathode. Dans le cas de la préparation LG la présence du constituant cathodique n'a pas pu être constatée avec certitude, par contre cet échantillon semblait contenir une faible quantité d'un deuxième constituant migrant vers l'anode un peu plus rapidement que le constituant principal.

Un dosage approximatif à partir de la préparation MJ de l'activité antitrypsique dans les fractions obtenues par électrophorèse préparative sur papier nous a montré que seul le constituant migrant vers l'anode était actif et qu'il était enrichi par rapport à l'ovomucoïde initial.

### *Electrophorèse sur gélose*

Tampon véronal sodique 0.025 *M*; pH 8.2; durée 5 heures; 4 V/cm. La révélation est faite par une solution d'Amidoschwarz.

Les produits suivants ont été examinés: LG, MK, MJ, et fraction C<sub>2</sub> provenant de la purification de la préparation MJ par électrophorèse sur colonne. La Fig. 1 représente une photographie de la plaque de gélose révélée à l'Amidoschwarz.

L'examen de la Fig. 1 appelle les remarques suivantes: (1) La préparation LG a donné une tache principale irrégulière et diffuse et une deuxième tache faible migrant vers l'anode et de mobilité supérieure à celle de l'ovalbumine, (2) la préparation MK forme deux taches, l'une à la hauteur de la tache principale voisine, l'autre aussi intense et migrant vers l'anode, située à l'emplacement de l'ovalbumine\*. La forme

\* Dans d'autres préparations d'ovomucoïde faites dans des conditions analogues, la tache de l'impureté n'a pas été observée.

diffuse de cette dernière tache indique que, s'il s'agit là de l'ovalbumine, celle-ci doit être dénaturée, ce qui est confirmé d'ailleurs par le fait que nous n'avons jamais observé par immunoélectrophorèse la formation de lignes à cette hauteur avec des sérums contenant des anticorps spécifiques anti-ovalbumine, (3) préparation MJ: une tache principale aux contours diffus et irréguliers, une languette de précipité située vers le bord négatif du réservoir d'origine, très fortement colorée correspondant probablement au lysozyme<sup>12</sup>, et enfin une tache faiblement colorée, migrant vers la cathode, (4) fraction C<sub>2</sub> provenant de la purification par électrophorèse sur colonne de la préparation MJ ne forme qu'une seule tache, présentant une forme diffuse.

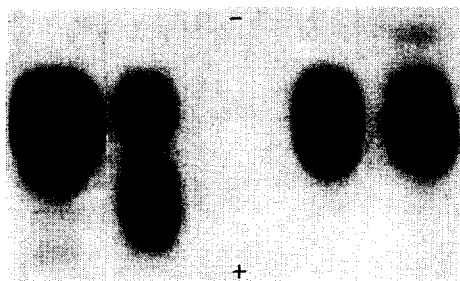


Fig. 1. Photographie de la plaque de gélose révélée à l'amidoschwarz après une électrophorèse dans le tampon véronal 0.025 M; pH 8.2; 3 V/cm pendant 6h. De gauche à droite, préparations LG, MK, C<sub>2</sub> et MJ.

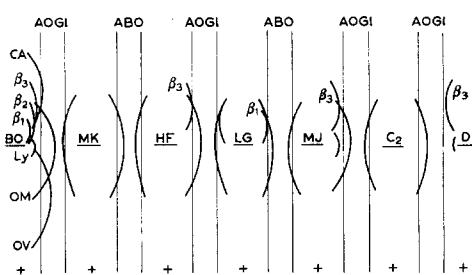


Fig. 2. Schéma des plaques d'immunoélectrophorèse (6 heures à 60 V) photographiées après trois jours. Antisérums: Anti-blanc d'oeuf (ABO) ou anti-ovoglobulines (AOGI). Les différentes préparations ont été disposées à l'endroit marqué par un trait; BO: blanc d'oeuf

complet. Les symboles suivants ont été adoptés pour désigner les lignes: CA, conalbumine;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , globulines correspondantes. Ly: lysozyme; OM, ovomucoïde; OV, ovalbumine.

### Immunoélectrophorèse

La Fig. 2 représente le schéma des plaques photographiées après 3 jours de réaction avec l'immunsérum. La conduite de l'électrophorèse a été la même que dans la technique précédente. La révélation a été faite avec l'antisérum anti-blanc d'oeuf ou anti-ovoglobulines. A titre de comparaison le blanc d'oeuf complet a été placé dans le premier réservoir. Les différentes préparations ont montré les lignes suivantes: MK, une seule ligne correspondant par son emplacement à la ligne de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf complet; HF, une ligne d'ovomucoïde et une autre correspondant à la  $\beta_3$ -globuline<sup>12</sup>; LG, une ligne d'ovomucoïde et une ligne dans la zone des  $\beta$ -globulines, différente des  $\beta$ -globulines présentes dans les préparations HF et MJ ( $\beta_1$ -globuline<sup>12</sup>). MJ, une ligne d'ovomucoïde, une ligne d'une  $\beta$ -globuline ( $\beta_3$ -globuline<sup>12</sup>) et une ligne d'une globuline identifiée avec le lysozyme par "dissolution à la goutte"<sup>13</sup>; la présence de lysozyme dans cette préparation se manifeste d'autre part par une précipitation en languette sur le bord négatif du réservoir<sup>12</sup>. C<sub>2</sub> (fraction provenant de la purification par électrophorèse sur colonne de la préparation MJ), une seule ligne correspondant à l'ovomucoïde. D (une impureté provenant de la purification de la préparation MJ comme ci-dessus), une faible ligne de la  $\beta_2$ -globuline et une, très faible, du lysozyme.

### Electrophorèse sur colonne de cellulose

Les différentes électrophorèses ont été faites dans les tampons acétate 0.1 M; pH 6

ou pH 4.4. L'échantillon à étudier correspondant à 100–300 mg de protéine est dissous dans quelques ml de tampon et la solution est ajustée exactement au pH du tampon, si nécessaire. Cette solution est introduite sur la colonne, suivie de 25 à 30 ml de tampon. Durée d'électrophorèse: 42 heures sous 160 volts à pH 6 et 70 heures sous 192 volts à pH 4.4.

Seule la préparation MJ, titrant 63 unités antitrypsiques par mg a été étudiée par ce procédé. Dans la première expérience, dont les résultats sont schématisés dans la Fig. 3, 251 mg d'ovomucoïde ont été utilisés.

Les conditions ont été les suivantes: tampon acétate 0.1 M, pH 6, 160 volts, pendant 42 heures. La Fig. 3 représente en abscisses les numéros des fractions de 4 ml recueillies au collecteur et en ordonnées, soit les valeurs des lectures faites sur ces fractions au photomètre à 278 m $\mu$  pour les courbes en trait plein, soit les valeurs de l'activité antitrypsique en unités pour les courbes en pointillé (cette dernière détermination ayant été faite seulement dans certaines fractions).

On observe la séparation de la préparation d'ovomucoïde étudié en six constituants, dont les proportions relatives, déterminées d'après les valeurs d'absorption, sont les suivantes: A 1.3 %, B 0.9 %, C<sub>1</sub> 0.5 %, C<sub>2</sub> 49.1 %, C<sub>3</sub> 2.1 %, D 36.2 %. La récupération totale en protéine, ainsi déterminée, est de l'ordre de 90 %. Les 10 % de protéine qui manquent restent fixés sur la colonne et ne peuvent être élués que par la soude 0.01 N.

Le dosage d'activité antitrypsique a été effectué dans les fractions suivantes:

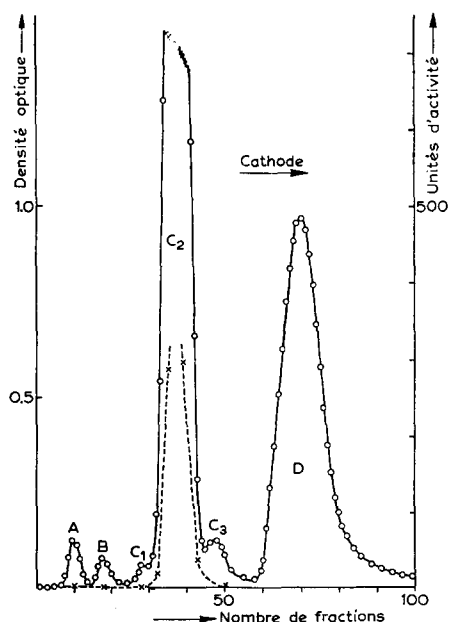


Fig. 3. Courbe d'éluion de la préparation MJ, après électrophorèse sur colonne. Trait plein: densités optiques à 278 m $\mu$ . Trait en pointillé: activité antitrypsique en unités par fraction. Tampon acétate 0.1 M; pH 6.0; 42 heures à 160 V.

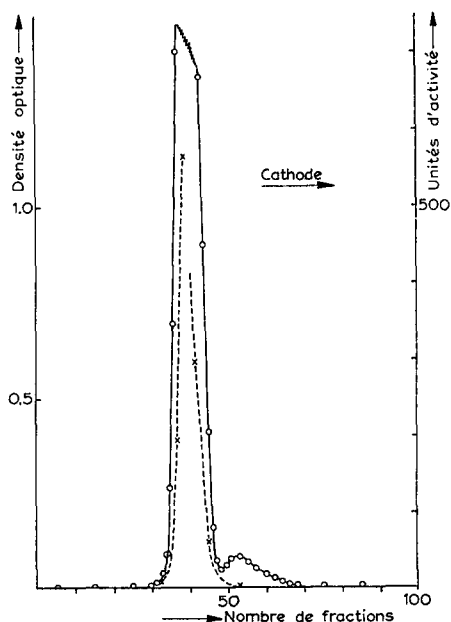


Fig. 4. Courbe d'éluion de la fraction C<sub>2</sub> après électrophorèse sur colonne. Trait plein: densités optiques à 278 m $\mu$ . Trait en pointillé: activité antitrypsique en unités par fraction. Tampon acétate 0.1 M; pH 6.0; 42 heures à 160 V.

10, 18, 28, 32, 35, 39, 43, 50 et 70. Les valeurs obtenues ont permis de tracer la courbe d'activité qui montre que seul le constituant  $C_2$  est actif.

Les fractions de 30 à 45, contenant le constituant actif  $C_2$ , ont été réunies, dialysées et lyophilisées. Le produit obtenu titre 82 unités par mg; il y a eu donc un enrichissement de 30 % par rapport au produit de départ.

La récupération de l'activité est de l'ordre de 64 %; il y a eu perte d'activité par dénaturation, soit au cours de l'électrophorèse, soit au cours des opérations qui suivent l'élution, c'est à dire dialyse ou lyophilisation.

109 mg du constituant  $C_2$  ainsi obtenu sont utilisés pour une nouvelle électrophorèse dans les mêmes conditions que précédemment, à pH 6. La courbe d'élution obtenue après cette électrophorèse est représentée dans la Fig. 4.

Un seul pic principal actif a été obtenu, suivi par une petite bosse due probablement au constituant  $C_3$  de l'électrophorèse précédente, incomplètement séparé. Aucune activité n'a été retrouvée dans cette bosse. La récupération en protéine a été de 99 %. Le rapport activité/absorption UV dans les fractions 35, 37, 39, 41, 45 donne des valeurs voisines, ne variant que dans les proportions de  $\pm 10\%$ , ces variations étant de l'ordre de grandeur des erreurs du dosage biologique, le produit obtenu semble ainsi relativement homogène. L'activité spécifique moyenne calculée à partir des valeurs obtenues pour ces différentes fractions est, pour l'ensemble du produit actif, de l'ordre de 93 unités par mg. Il y a donc un certain enrichissement par rapport au produit  $C_2$ , la récupération de l'activité étant quantitative à ce stade.

Les fractions de 32 à 48 ont été réunies, dialysées et lyophilisées. Le produit sec  $C_2'$  obtenu titre 70 unités par mg; une perte d'activité s'est produite à ce dernier stade de l'opération, malgré les précautions que nous avons pu prendre et qui consistent notamment à effectuer toutes les opérations à basse température (2 à 4° C). Cette inactivation est d'autant plus surprenante que l'ovomucoïde est généralement considéré comme une protéine très stable<sup>1</sup>.

Pour contrôler l'homogénéité du produit  $C_2'$  une troisième électrophorèse a été effectuée dans le tampon acétate 0.1 M; pH 4.4, (192 V pendant 70 heures). 88 mg de la préparation  $C_2'$  ont été utilisés. Le pH 4.4 a été choisi pour se rapprocher le plus possible du point isoélectrique de l'ovomucoïde.

La Fig. 5 représente le résultat de cette électrophorèse.

Un pic a été obtenu, avec un rendement global en protéine de 84 %. Pour éluer les 16 % de protéine manquants, constitués probablement par l'ovomucoïde dénaturé, il a fallu, comme dans la première électrophorèse, laver la colonne par la soude 0.01 N. La détermination de l'activité anti-

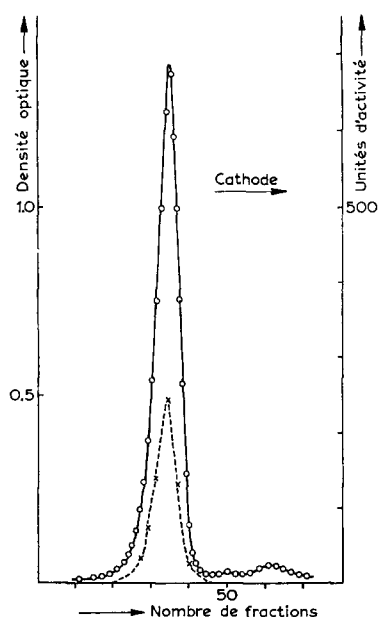


Fig. 5. Courbe d'élution de la fraction  $C_2'$ , après électrophorèse sur colonne. Trait plein: densités optiques à 278 m $\mu$ . Trait en pointillé: activité antitrypsique en unités par fraction. Tampon acétate 0.1 M; pH 4.4; 70 heures à 192 V.

trypsique a été faite dans les fractions 27, 29, 31, 34, 37, 39, et 40. Le rapport activité/absorption UV dans ces différentes fractions étant constant aux erreurs du dosage biologique près, c'est à dire  $\pm 8\%$  dans cet essai, le produit actif se comporte comme une protéine homogène. Le calcul de l'activité spécifique moyenne à partir des valeurs obtenues pour les fractions titrées donne le chiffre de 107 unités par mg; on peut conclure, en tenant compte du poids du produit, que la récupération de l'activité a été quantitative à ce stade.

Cependant les fractions de 20 à 45 réunies, dialysées et lyophilisées, ont fourni un produit sec titrant 73 unités par mg, c'est à dire sensiblement la même valeur qui a été obtenue pour le produit C<sub>2</sub>'. Le même phénomène d'inactivation s'est produit, comme dans l'opération précédente, à ce dernier stade de préparation.

#### CONCLUSIONS

Il apparaît ainsi que l'ovomucoïde, tel qu'il est obtenu, soit par la méthode de LINEWEAVER ET MURRAY<sup>1</sup>, soit par celle de FREDERICQ ET DEUTSCH<sup>2</sup>, n'est pas une protéine homogène. Suivant la technique utilisée pour leur préparation, les différents échantillons d'ovomucoïde contiennent des impuretés constituées principalement par certaines globulines ( $\beta$ -globulines et lysozyme) et éventuellement, par l'ovalbumine plus ou moins dénaturée. Certaines des impuretés qui accompagnent l'ovomucoïde dans la préparation MJ sont présentes en proportion si faible (0.5 % pour le constituant C<sub>1</sub> par exemple), que seule, l'électrophorèse sur colonne<sup>9,10</sup> permet ici leur mise en évidence. Cette mise en évidence de l'hétérogénéité des préparations d'ovomucoïde est une confirmation des observations analogues faites par d'autres auteurs<sup>1,2,3</sup>.

Il faut signaler à ce sujet que BIER et coll.<sup>3</sup> ont trouvé dans les préparations d'ovomucoïde, effectuées selon les mêmes procédés que les nôtres, cinq constituants peu différents, tous actifs comme antitrypsines. Pour cela ces auteurs ont utilisé soit l'électrophorèse de frontière, soit l'électrophorèse convection<sup>14</sup> dans les conditions suivantes: tampon acétate de force ionique 0.01, à pH 4 à 4.5. Or, notre dernière électrophorèse sur colonne, dans le tampon acétate à pH 4.4 mais de force ionique plus élevée, n'a permis de déceler aucune trace d'hétérogénéité dans l'ovomucoïde purifié (voir Fig. 5). Les raisons du désaccord entre les résultats de BIER et coll.<sup>3</sup> et les nôtres restent encore inexplicables.

Il paraît intéressant de signaler que l'ovomucoïde suffisamment purifié se dénature facilement lors des opérations de lyophilisation (ou de dialyse), alors qu'il est particulièrement résistant lorsqu'il est accompagné des autres protéines du blanc d'oeuf<sup>1</sup>. Ainsi nous avons pu réaliser en solution, par deux électrophorèses successives, un enrichissement croissant en protéine active, mais chaque fois que nous voulions l'obtenir à l'état sec, nous retombions sur un produit ayant approximativement le même titre qu'au départ.

L'immunoélectrophorèse démontre qu'il existe une différence dans les propriétés antigéniques de l'ovomucoïde d'une préparation à l'autre. Nous avons en effet remarqué que si la spécificité immunologique était la même pour toutes les préparations étudiées\*, la préparation MK qui n'a jamais été lyophilisée mais conservée en solution, formait toujours avec l'anticorps correspondant un précipité plus abondant

\* Cette spécificité a été vérifiée par la coalescence de lignes lors de la précipitation spécifique en milieu gélifié selon la technique d'OUCHTERLONY<sup>15</sup>.

et plus stable que les autres préparations qui ont été toutes lyophilisées. Il est possible que l'antigène contenu dans les préparations lyophilisées ait été légèrement dénaturé et que sa faculté de précipiter avec l'anticorps homologue ait été par cela diminuée. Cependant cette antigénicité était encore suffisante pour que nous ayons pu, en injectant au lapin l'ovomucoïde MJ (adsorbé sur une suspension d'alumine et non, comme on le fait habituellement, en présence du mélange adjuvant de FREUND<sup>16</sup>), préparer un sérum précipitant, contenant deux sortes d'anticorps: l'anticorps principal correspondant à la  $\beta_3$ -globuline et l'anticorps anti-ovomucoïde, ce dernier formé malgré la faible antigénicité de l'ovomucoïde.

L'électrophorèse sur colonne de cellulose<sup>9,10</sup> permet la récupération quantitative, et en quantité de l'ordre de plusieurs centaines de milligrammes, des produits séparés, elle peut donc servir comme méthode de purification. Nous avons pu ainsi préparer à partir de 250 mg (500 mg dans d'autres expériences) d'ovomucoïde obtenu selon la méthode de LINEWEAVER ET MURRAY<sup>1</sup> des quantités de l'ordre de 120 mg (ou 250 mg) d'un ovomucoïde électrophorétiquement et immunologiquement homogène.

### RÉSUMÉ

La pureté de quelques préparations d'ovomucoïde, faites selon deux procédés différents<sup>1,2</sup> a été contrôlée par électrophorèse sur papier et sur gélose, immunoelectrophorèse et électrophorèse sur colonne de cellulose. Toutes les préparations étudiées apparaissent hétérogènes. L'électrophorèse sur colonne de cellulose permet d'isoler le constituant doué d'activité anti-trypsique qui, étudié par une nouvelle électrophorèse sur colonne à pH voisin du point isoélectrique de l'ovomucoïde et par immuno-electrophorèse, paraît homogène.

### SUMMARY

The purity of some ovomucoid preparations obtained by two different methods<sup>1,2</sup> has been checked by electrophoresis on paper and on gelose, immunoelectrophoresis and electrophoresis on a cellulose column. All the preparations studied appear to be heterogeneous. By electrophoresis on a cellulose column the constituent with antitryptic activity can be isolated. After being subjected to a new column electrophoresis at a pH near the isoelectric point of ovomucoid, and to immunoelectrophoresis, this constituent is found to be homogeneous.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. LINEWEAVER ET C. W. MURRAY, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 565.
- <sup>2</sup> E. FREDERICO ET H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 499.
- <sup>3</sup> M. BIER, L. TERMINIELLO, J. A. DUKE, R. J. GIBBS ET F. F. NORD, *Arch. Biochem. Biophys.*, 47 (1953) 465.
- <sup>4</sup> J. T. EDSALL, *Advances in Protein Chem.*, 3 (1947) 384.
- <sup>5</sup> R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 552.
- <sup>6</sup> J. URIEL ET J. J. SCHEIDEGGER, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 165.
- <sup>7</sup> J. URIEL ET P. GRABAR, *Ann. inst. Pasteur*, 90 (1956) 427.
- <sup>8</sup> P. GRABAR ET C. A. WILLIAMS, JR., *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 67.
- <sup>9</sup> P. FLODIN ET J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 175.
- <sup>10</sup> P. FLODIN ET D. W. KUPKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 368.
- <sup>11</sup> L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 570.
- <sup>12</sup> M. KAMINSKI, *J. Immunol.*, 75 (1955) 367.
- <sup>13</sup> M. KAMINSKI ET J. DURIEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1037.
- <sup>14</sup> J. R. CANN, J. G. KIRKWOOD, R. A. BROWN ET O. J. PLESCIA, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 1603.
- <sup>15</sup> O. OUCHTERLONY, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 21 B (1948) 14.
- <sup>16</sup> L. R. WETTER ET H. F. DEUTSCH, *Arch. Biochem.*, 28 (1950) 399.

Reçu le 7 Mai 1956