Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 23 (1970)
Heft: 1

Artikel: Étude des protéines des graines d'une léguminieuse : Lablab niger Medik
Autor: Miège, M.N.
Kapitel: 1: Matériel et méthodes
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739136

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 09.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Chapitre Premier

MATÉRIEL ET MÉTHODES

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

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

Après chaque extraction, le résidu insoluble fut séparé du solvant par centrifugation à 30 000 g pendant une demi-heure [1].

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

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

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

---

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

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

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

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

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

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

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

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

---

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

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

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