

<b>Zeitschrift:</b>	Archives des sciences [1948-1980]
<b>Herausgeber:</b>	Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
<b>Band:</b>	23 (1970)
<b>Heft:</b>	1
<b>Artikel:</b>	Étude des protéines des graines d'une léguminieuse : Lablab niger Medik
<b>Autor:</b>	Miège, M.N.
<b>Kapitel:</b>	4: Étude des familles protéiques
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.5169/seals-739136">https://doi.org/10.5169/seals-739136</a>

### 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:** 12.01.2026

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

## CHAPITRE 4

### ÉTUDE DES FAMILLES PROTÉIQUES

#### I. ANALYSE DES FAMILLES PROTÉIQUES

Les deux grandes familles, albumines et globulines, sont définies sans ambiguïté. Elles sont caractérisées essentiellement par leur aptitude à se dissoudre ou non dans l'eau pure. Les difficultés commencent avec le fractionnement de ces familles en entités constitutives.

##### 1. *Facteurs affectant la précipitation des pseudoglobulines*

Rappelons les caractères généraux des pseudoglobulines: insolubilité dans les solutions saturées à 50% par le sulfate d'ammonium et solubilité dans l'eau pure et les solutions salines diluées, coagulabilité par la chaleur et autres agents dénaturants.

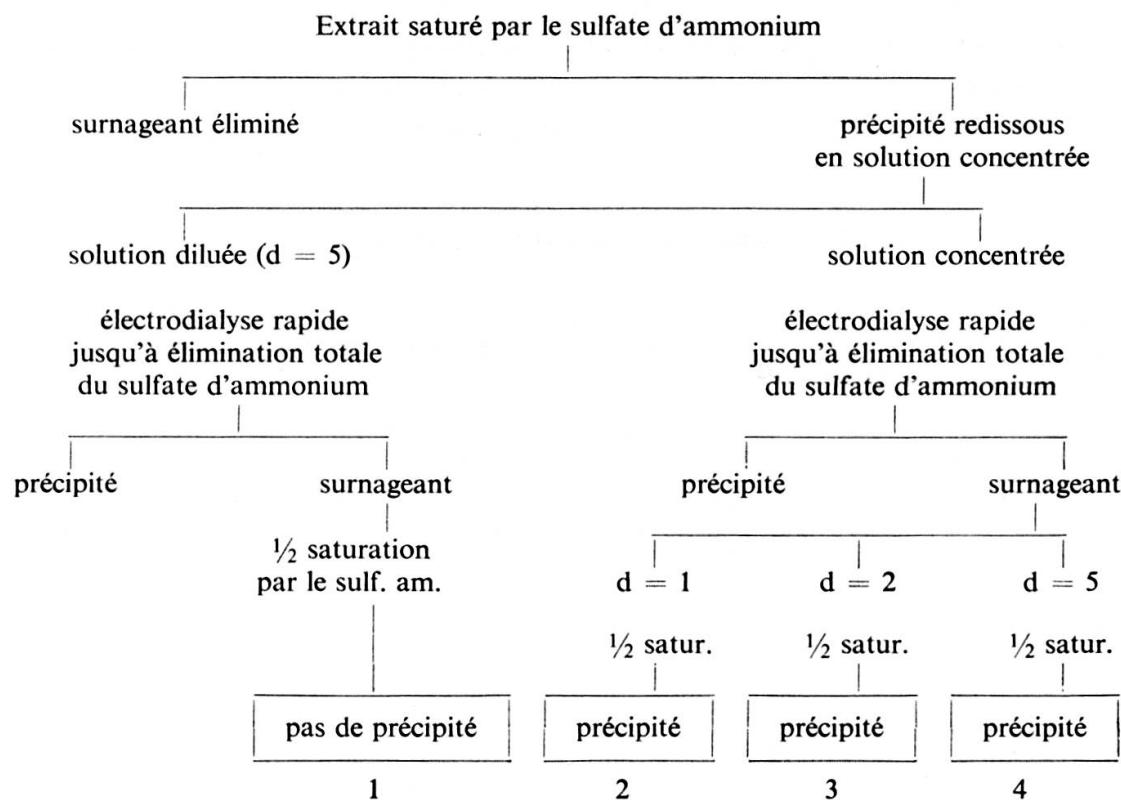
Nous voulions appliquer cette distinction aux protéines cotylédonaires et avons, en effet, isolé une famille répondant à ces caractéristiques. Mais, si nous avons, dans les tableaux du chapitre 3, fait figurer uniquement les teneurs globales en albumines et pseudoglobulines au lieu d'exprimer les teneurs respectives en chacune de ces familles, c'est que nous avons constaté des défauts dans la reproductibilité de la précipitation des pseudoglobulines.

Dans certains cas, aucun précipité ne se forme par demi-saturation du surnageant provenant de la centrifugation des extraits dialysés, que la dialyse ait été appliquée directement aux extraits ou qu'elle ait eu lieu après précipitation préalable des protéines par le sulfate d'ammonium à saturation. Ce fait se constate aussi bien dans le cas de dialyses simples que d'électrodialyses. Il se constate également sur des extraits provenant de farines fraîchement moulues aussi bien que sur d'autres provenant de farines conservées, dans le cas de graines jeunes que dans celui de graines âgées.

L'influence de la concentration des protéines dans la solution mère a tout d'abord été soupçonnée. Il semble cependant que l'explication ne soit pas si simple, ainsi que le montrent les résultats de l'essai suivant: un extrait aqueux de farine fraîchement moulue a été saturé par le sulfate d'ammonium. Le précipité, redissous dans très peu d'eau, a été dialysé. Après séparation des globulines, le surnageant a été fractionnée en plusieurs parts. La précipitation des pseudoglobulines a été effectuée sur une part non diluée, puis sur les autres ayant subi des dilutions croissantes. A toutes les dilutions, les pseudoglobulines ont précipité. Le même essai fut alors recommencé, mais en effectuant la dilution avant la dialyse selon le schéma suivant:

## SCHÉMA 4

*Recherche de l'influence de la concentration avant dialyse sur la précipitation des pseudoglobulines*



Au moment de la demi-saturation par le sulfate d'ammonium, les solutions des cas n°s 1 et 4 présentent exactement la même concentration en protéines et en sulfate d'ammonium, or seule la solution n° 4 donnera lieu à une précipitation.

Ainsi, il apparaît que les pseudoglobulines ne supportent pas la dialyse, même rapide, en solution diluée. Elles précipitent et grossissent alors artificiellement le lot des globulines. C'est donc une dénaturation, favorisée par la dilution, qui détermine l'absence d'apparition des pseudoglobulines dans certains cas et non la dilution elle-même.

Cette fragilité des pseudoglobulines révélée ici a, par ailleurs, été constatée lors d'essais de purification à partir de solutions suffisamment concentrées avant dialyse, la purification ayant lieu de la manière suivante: le précipité de pseudoglobuline était dissous, électrodialysé puis reprécipité par demi-saturation. A chaque répétition de cette opération, lors de la dialyse, une nouvelle quantité de pseudoglobuline précipitait irréversiblement.

L'étude électrophorétique permettra de mieux percevoir les liens de parentés qui unissent cette famille aux albumines. La conclusion qui s'impose actuellement est que la distinction albumine-pseudoglobuline telle qu'elle est pratiquée sur les protéines d'origine animale ne peut être appliquée aux protéines de graines. La

concentration protéique n'est pas, en effet, un paramètre variable dans les humeurs d'origine animale (serum, lait, œuf, ...). Par contre, les protéines de graines subissent une extraction préalable des modalités de laquelle dépend la concentration des solutions protéiques obtenues. Désormais nous ne distinguerons plus les pseudoglobulines des albumines que dans certains cas particuliers; le terme général famille albuminique englobera les albumines et les pseudoglobulines, c'est-à-dire les protéines solubles dans l'eau pure et les solutions salines diluées.

## 2. Constitution des familles protéiques

Les teneurs en azote, phosphore et sucres des 3 familles que nous avons définies au début de ce travail ont été déterminées et figurent dans le tableau 19.

TABLEAU 19

*Teneur en azote, phosphore et glucides des albumines, pseudoglobulines et globulines exprimées en pourcentage du poids sec de la protéine.*

	A	Pg	G
N	14,8	18,0	15,8
P	0,06	0,07	0,28
Glucides	8,8	2,1	6,0

La famille albuminique (albumines, pseudoglobulines) ne contient que des traces de phosphore. Par contre, les globulines en possèdent des teneurs beaucoup plus importantes.

Certains auteurs attribuent la présence de phosphore trouvé dans les globulines à des impuretés entraînées lors de la précipitation. Nous pensons plutôt que ce phosphore fait partie de la molécule. Nous avons vu que la précipitation par le sulfate d'ammonium et la dialyse éliminent les impuretés éventuelles. Les auteurs situent d'ailleurs la fixation des impuretés phosphorées sur le précipité au niveau de la première précipitation par le sulfate d'ammonium, une partie du précipité présentant une très forte teneur en phosphore serait alors rendue définitivement insoluble. Nous n'avons, quant à nous, constaté aucune insolubilisation définitive à cette étape. Tout le précipité se remet intégralement en solution; rien ne s'oppose alors à l'élimination des impuretés par dialyse.

En comparant la constitution des albumines et des pseudoglobulines, des contrastes intéressants apparaissent. Les taux de sucres présentent des valeurs

extrêmes: les albumines sont les plus riches de toutes les protéines cotylédonaires, les pseudoglobulines les plus pauvres. A cette faible teneur en sucre des pseudoglobulines correspond une forte teneur en azote. Or, nous savons que la présence de fortes quantités de sucres dans une molécule protéique lui confère souvent une grande stabilité. L'inverse peut se vérifier dans certains cas et il est permis de voir dans la relative absence de glucides chez les pseudoglobulines une des raisons de leur grande instabilité.

### *3. Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique des familles protéiques*

Les électrophorèses ont eu lieu sur gel d'agar ou d'agarose, de concentration 1,5 %, et tamponné à pH 8,6 par un mélange véronal acide-véronal sodique de force ionique 0,033.

#### a) *Albumines*

Contrairement aux albumines sériques qui, soumises à l'électrophorèse dans les mêmes conditions, sont homogènes et accusent une forte mobilité anodique, les albumines cotylédonaires de dolique sont très hétérogènes et ont des mobilités, à la fois anodiques et catodiques, très diverses de presque nulle à très forte (figure 6). On dénombre 7 fractions anodiques et 2 catodiques.

L'analyse immunoélectrophorétique confirme la grande complexité des albumines (11 arcs sont denombrés, figure 16, chapitre 5).

#### b) *Pseudoglobulines*

Alors que l'étude des proportions des constituants élémentaires révèle d'importantes différences entre les albumines et les pseudoglobulines, l'observation des électrophorégrammes permet de constater une grande identité comme en témoigne la figure 7 représentant une électrophorèse des deux familles effectuée sur la même lame donc dans des conditions absolument identiques.

Une autre constatation dénote également une parenté structurale entre albumines et pseudoglobulines: l'immunserum antipseudoglobulines réagit positivement avec les albumines et l'immunserum antialbumines réagit de même avec les pseudoglobulines.

L'étroite parenté des deux familles révélée par la similitude de comportement antigénique et électrophorétique est encore renforcée par la similitude des pH de solubilité minimum (zone de 4,9 à 5,2).

Cette grande similitude entre albumines et pseudoglobulines permet l'hypothèse suivante: nous avons vu que les albumines sont assez riches en glucides. Chaque fraction pourrait avoir son homologue presque dépourvu de sucres, par là moins stable, apte alors à précipiter dans certaines conditions par le sulfate d'ammonium

à  $\frac{1}{2}$  saturation, alors que les albumines exigent des solutions saturées. La précipitation spontanée de ces fractions pauvres en glucides serait progressive et dénaturante

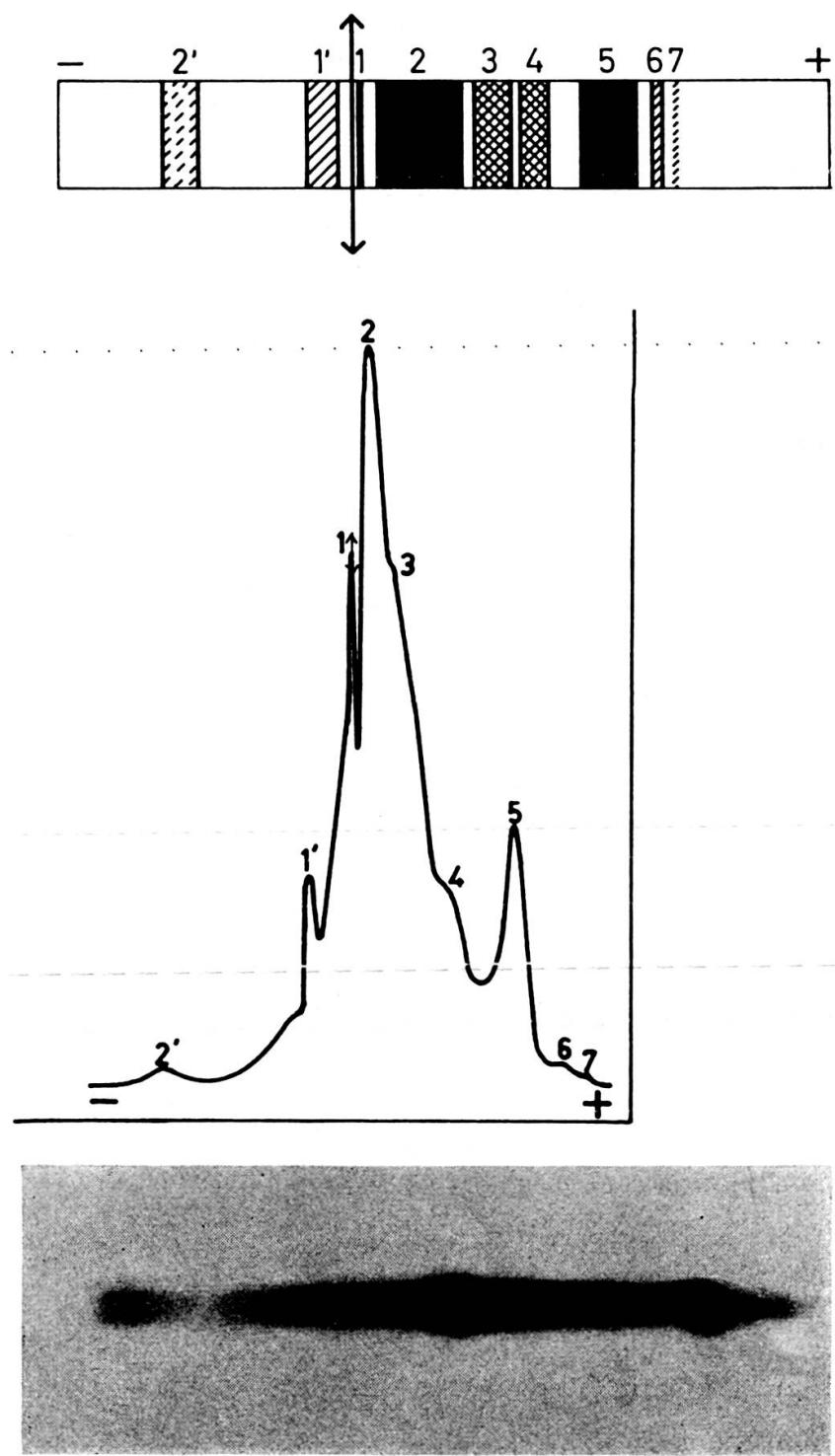


FIG. 6. — Diagramme électrophorétique et courbe densitométrique des albumines.

au cours de dialyses comme nous l'avons vu et comme le confirme l'essai de purification suivant.

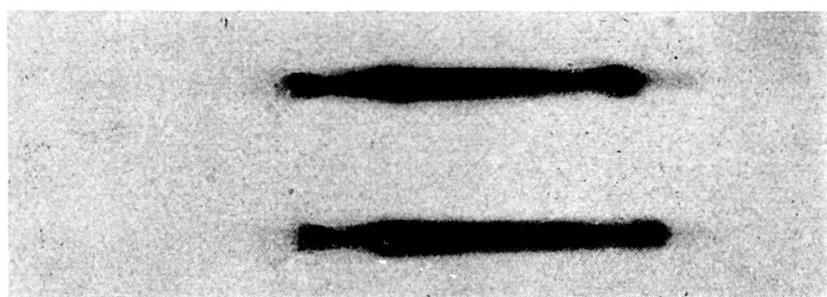
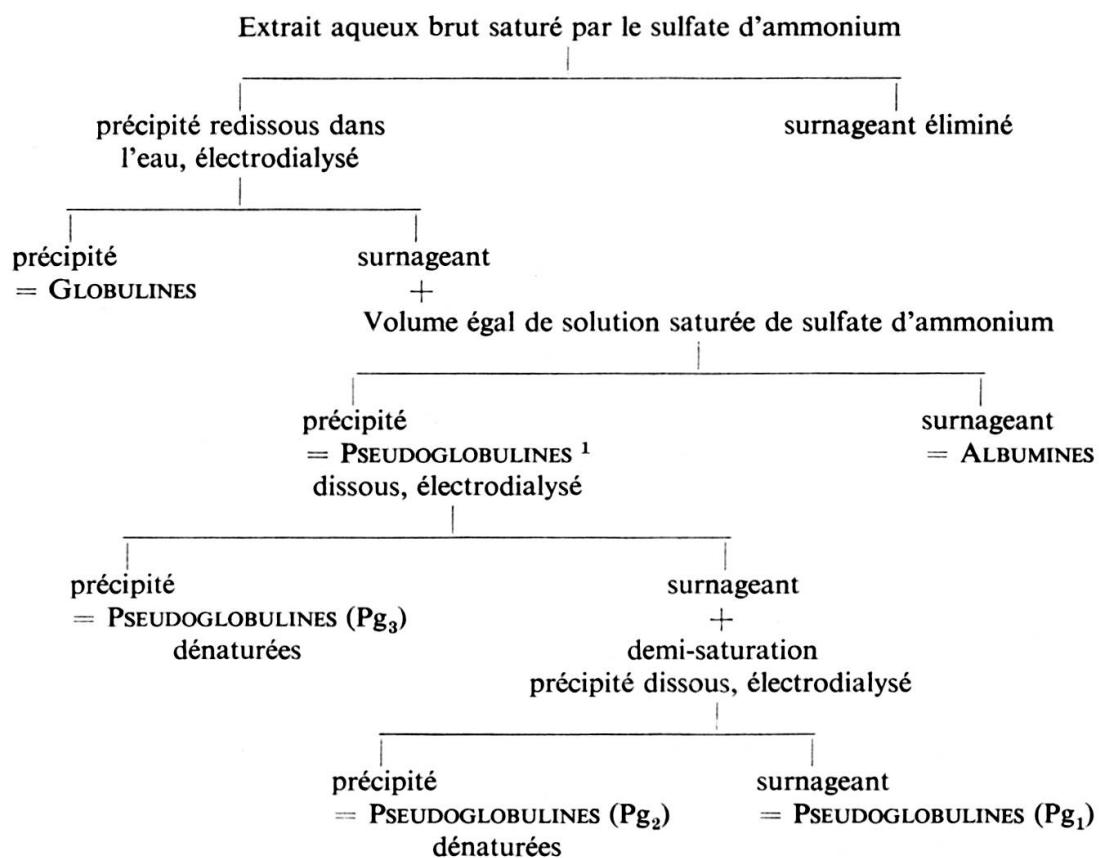


FIG. 7. — Diagramme d'électrophorèses simultanées des albumines et des pseudoglobulines.

Cet essai porte sur la solution albuminique totale, les opérations d'isolement et de purification<sup>1</sup> des pseudoglobulines sont résumées dans le schéma 5.

#### SCHÉMA 5

##### *Isolement et purification des Pseudoglobulines<sup>1</sup>*



<sup>1</sup> Une purification moins poussée mais plus rapide des pseudoglobulines peut être obtenue en lavant le précipité de pseudoglobulines avec une solution demi-saturée de sulfate d'ammonium. La purification pratiquée ici permet de confirmer l'instabilité de cette famille.

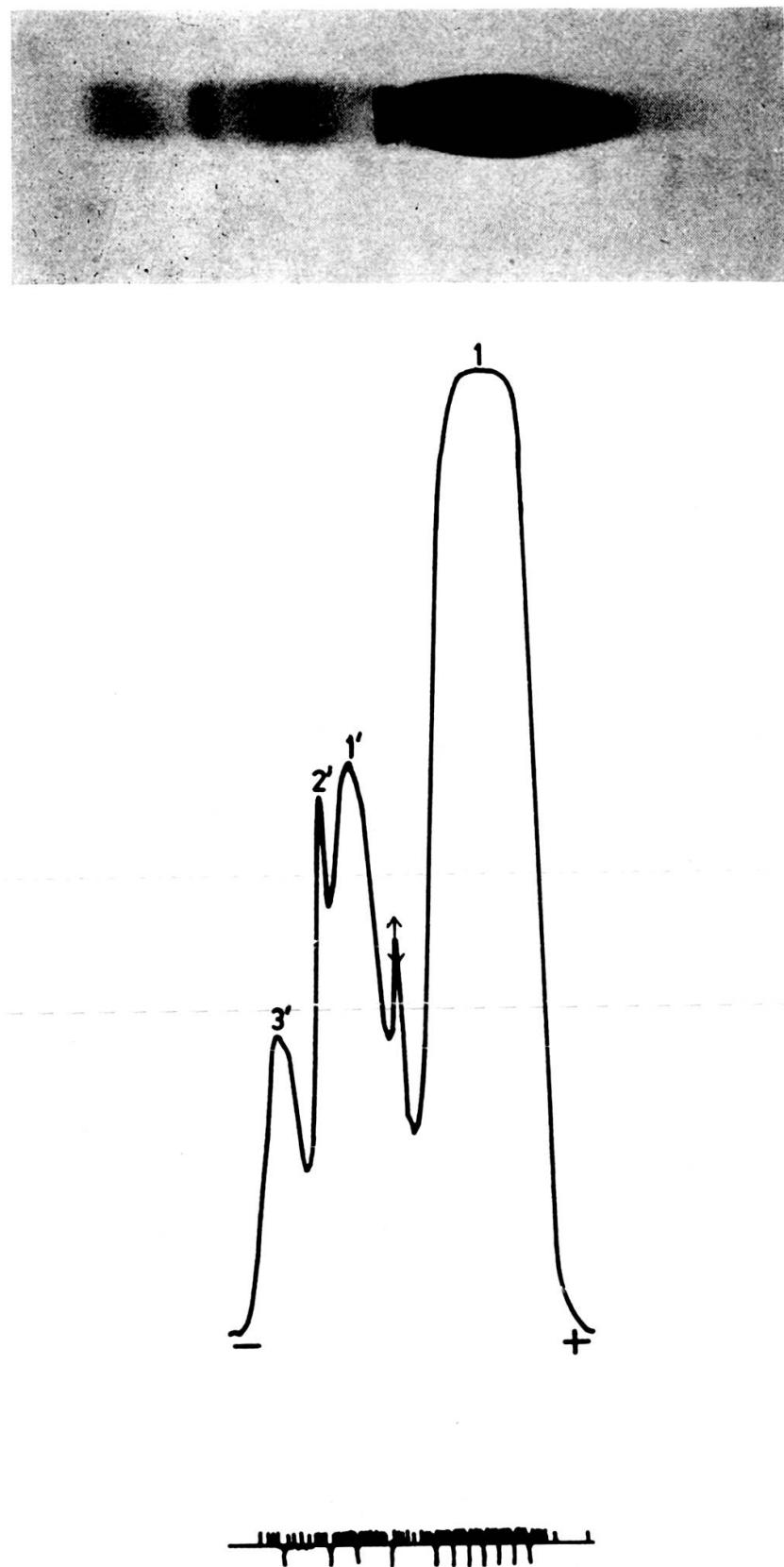


FIG. 8. — Electrophorégramme et courbe densitométrique des globulines.

La formation des précipités que nous appelons Pg<sub>2</sub> et Pg<sub>3</sub> est anormale puisque les pseudoglobulines, de même que les albumines qui peuvent souiller le précipité de départ, sont solubles dans l'eau pure. Ces précipités correspondent donc à une dénaturation. Ils sont, en effet, irréversibles. A la fin, il ne reste en solution qu'un tiers environ des pseudoglobulines de départ. Or le diagramme de ces pseudoglobulines restantes est en tous points identique à celui des pseudoglobulines initiales, aucune fraction n'en est absente. Ce ne sont donc pas des fractions particulières qui se sont dénaturées, mais une partie, semble-t-il, de toutes les fractions constitutives.

### c) Globulines

La complexité des globulines totales est révélée par la figure 8. Trois fractions catodiques sont bien distinctes. La tache majeure anodique groupe certainement plusieurs fractions confondues. Son importance quantitative est considérable comme

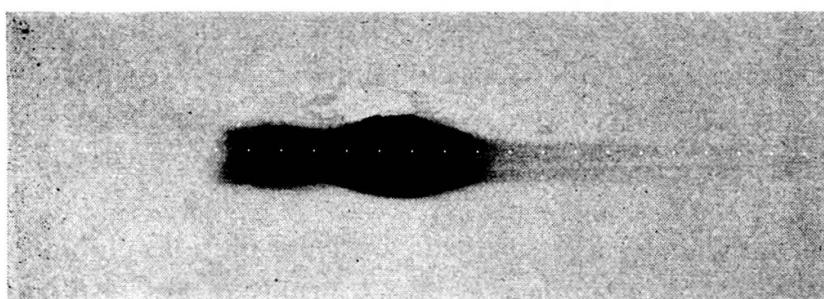


FIG. 9. — Diagrammes d'électrophorèses rapides (15 minutes) des globulines.

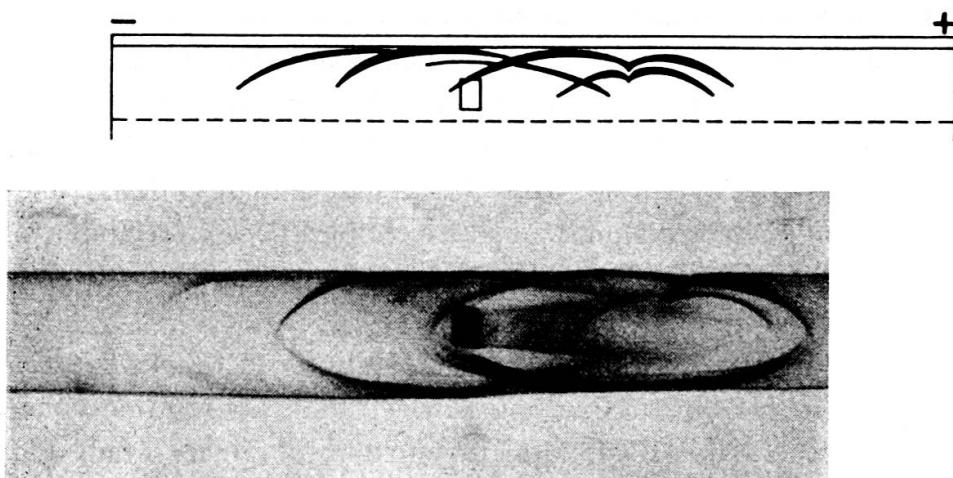


FIG. 10. — Immuno électrophorégrammes des globulines diffusées contre 2 immunoserum antiglobulines (2 lapins différents).

le montre la courbe densitométrique dont l'intégration des surfaces permet de préciser les rapports suivants: 1:76%; 1':12%; 2':5%; 3':7%.

Une seconde fraction anodique d'une extrême mobilité passe inaperçue sur la plupart des diagrammes. Pour la révéler, il faut limiter les électrophorèses à des durées très brèves. Les autres fractions sont alors encore très indistinctes les unes des autres (figure 9).

L'examen de l'immunoélectrophorégramme des globulines (figure 10) permet de distinguer, pour la fraction majeure anodique, au moins 5 entités différentes, ce qui porterait à un minimum de 9 le nombre de fractions globuliniques.

## II. FRACTIONNEMENT DES FAMILLES PROTÉIQUES

### 1. Fractionnement des globulines par voie chimique

La famille globulinique se prête généralement bien à une séparation par précipitation fractionnée à l'aide d'une saturation progressive en sulfate d'ammonium.

Le fractionnement appliqué aux globulines totales comportait, en première étape, une précipitation isoélectrique par acidification, les globulines restantes étaient alors précipitées successivement par saturation progressive avec le sulfate d'ammonium.

Deux essais ont eu lieu successivement sur deux solutions globuliniques de même force ionique ( $\frac{\Gamma}{2}=0,3$ ), l'une diluée, l'autre concentrée. Les résultats obtenus sont différents dans les deux cas. Les opérations de fractionnement appliquées respectivement aux solutions concentrée et diluée sont résumées dans le schéma 6.

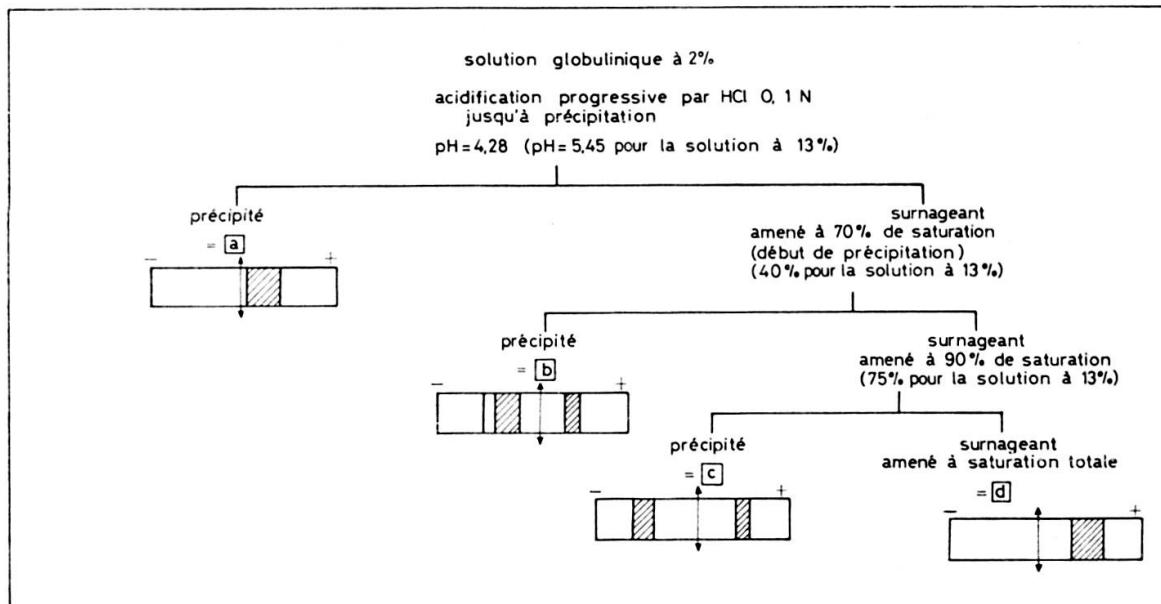
Nous constatons qu'en solution concentrée la précipitation des globulines commence pour une saturation de 40% en sulfate d'ammonium alors qu'en solution diluée, il faut aller jusqu'à 70%. Une valeur intermédiaire du degré de saturation minimum précipitant a été constatée dans le cas d'une solution globulinique de concentration moyenne. Ainsi, il apparaît que la distinction de certaines globulines, faite par beaucoup d'auteurs et basée sur la détermination de la zone de saturation des solutions de sulfate d'ammonium susceptibles de les précipiter, est ambiguë et ne peut avoir de valeur que complétée par la détermination de la concentration des solutions protéiques mères.

L'influence de la concentration des solutions mères se fait également sentir sur la valeur du pH de précipitation isoélectrique. En solution concentrée, la précipitation commence à pH 5,45 alors qu'en solution diluée, il faut descendre jusqu'à pH 4,28. Si l'on admet que les protéines ne modifient pas de façon sensible la force ionique des solutions, les variations constatées sont bien dues aux différences de concentration protéique. Nous avons constaté par ailleurs que les variations de force ionique des solutions protéiques influencent les valeurs du pH de solubilité minimum. Pour une même concentration protéique, nous avons trouvé à  $\frac{\Gamma}{2} = 0,3$  un pH de solubilité minimum de 5,1 et à  $\frac{\Gamma}{2} = 0,7$  un pH de 3,8. On peut en conclure

que les globulines sont plus stables en solutions lorsqu'elles sont dissoutes à faible concentration dans des solutions de force ionique assez élevée ( $> 0,68$ ).

### SCHÉMA 6

*Fractionnement\* appliqué à une solution diluée de globulines (2%) et à une solution concentrée (13%)*



Seules la fraction isoélectrique et celle précipitée par le sulfate d'ammonium à saturation sont homogènes. Elles appartiennent à la fraction anodique majeure. Les autres sont composées d'un mélange d'une fraction anodique et d'une autre catodique.

## 2. Fractionnement des familles protéiques par chromatographie sur DEAE cellulose

Le pH de solubilité minimum, qui est généralement le reflet du point isoélectrique, se situe, pour les familles analysées globalement, aux alentours de 5 ou plus bas. Certaines fractions mineures ont cependant un point isoélectrique beaucoup plus élevé puisque des électrophorèses effectuées à pH 8,6 révèlent encore des fractions à migration catodique dans l'une et l'autre famille. Néanmoins, une chromatographie sur cellulose anionique avec élution par gradient de concentration saline devrait permettre une bonne séparation de la plupart des fractions.

Les deux familles, albumines et globulines, furent soumises à une chromatographie sur colonne de DEAE cellulose.

\* Les précipités sont purifiés ainsi: a — par dissolution à pH7 et reprécipitation par acidification; b, c, d — par lavage avec une solution de sulfate d'ammonium saturée au même degré que celui de la première précipitation.

a) *Albumines*

Les meilleurs résultats furent obtenus en combinant l'action de deux gradients l'un de force ionique et l'autre de pH.

Le chromatogramme figure 11, révèle 4 pics principaux.

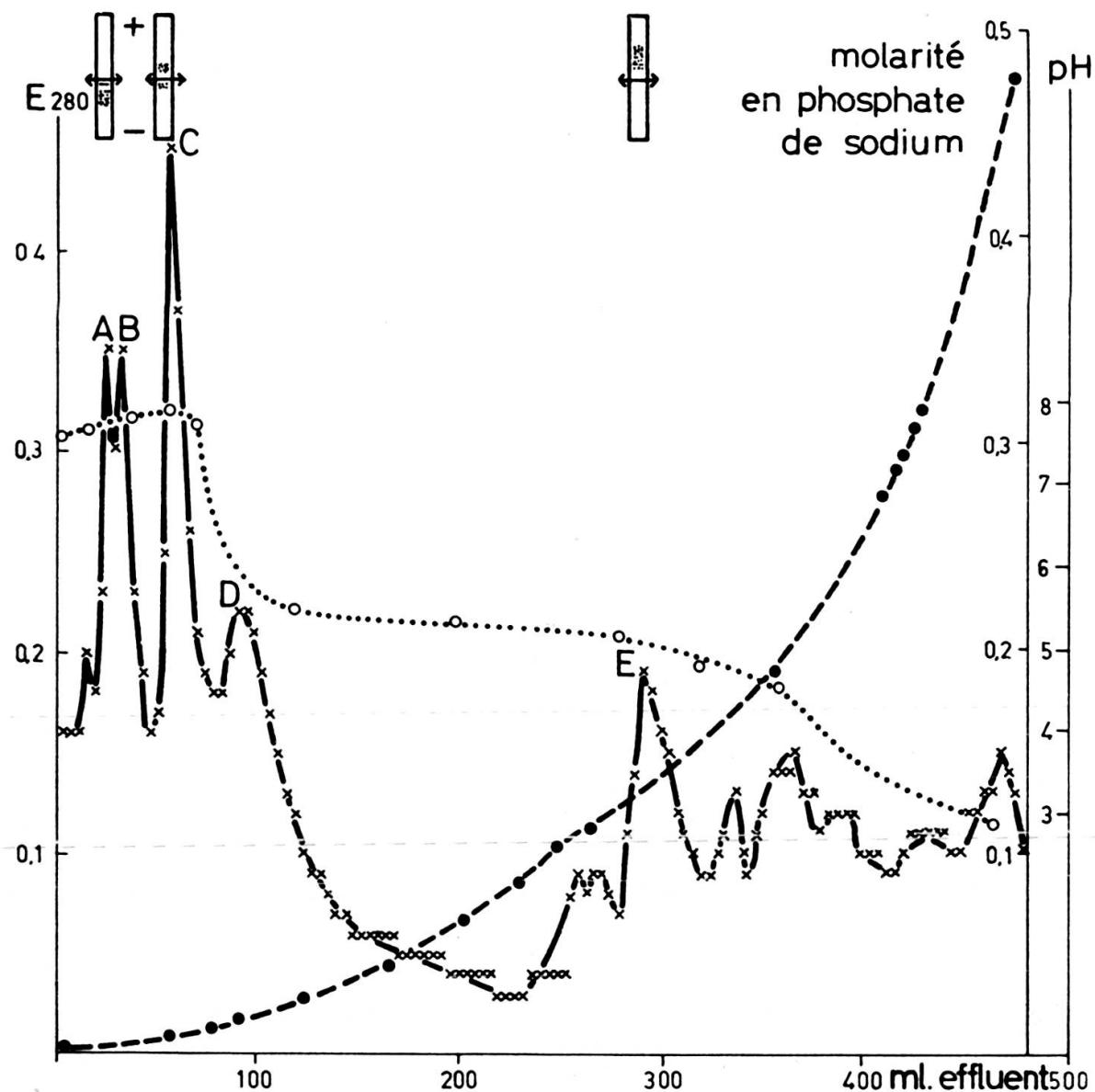


FIG. 11. — Chromatographie des albumines sur DEAE cellulose.  
Colonne: 1,5 cm × 30 cm. Protéines appliquées: 80 mg. Taux de protéines récupérées: 71%.  
Effluent: 500 ml par fractions de 4 ml.

Gradient mixte, à allure exponentiel, de force ionique et de pH  
réalisé à l'aide de 2 tampons suivants:

1) Tampon phosphate 0,005 M pH 7,5.

2) Tampon phosphate 0,5 M pH 3.

x—x Chromatogramme.

●—● Gradient de force ionique.

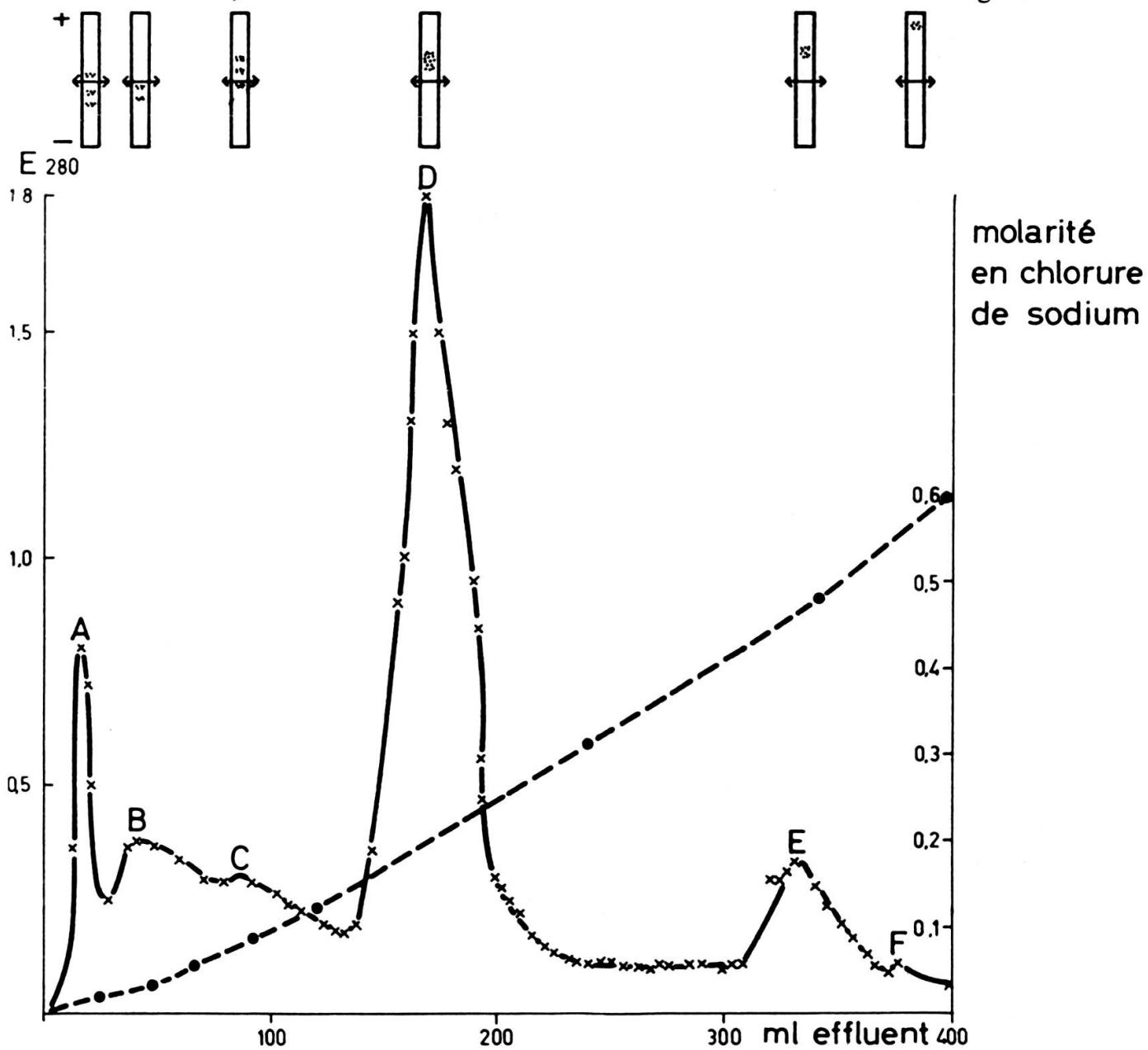
o—o Gradient de pH (mesuré à la sortie de la colonne).

On notera que la courbe représentant le gradient de pH obtenu à la sortie de la colonne s'écarte, surtout au début, de la forme que théoriquement elle devrait avoir.

On note en effet une augmentation du pH qui ne s'explique que par l'interférence des protéines éluées.

### b) Globulines

Un premier fractionnement, mettant en jeu un gradient linéaire de concentration saline, a montré que la majorité des globulines sont élués pour une concentration en NaCl < 0,1 M. Un étalement de cette zone a été réalisé en donnant au gradient



\* L'électrophorégramme schématisé au niveau du pic A compte une erreur accidentelle: la fraction anodique est en réalité cathodique et doit figurer juste sous la ligne de départ.

FIG. 12. — Chromatographie des globulines sur DEAE cellulose.  
Colonne: 1 cm × 18 cm. Poids de protéines appliquées: 150 mg.  
Taux de protéines récupérées: 69%. Effluent: 400 ml par fractions de 3 ml.

$\times \text{---} \times$  Chromatogramme.  
 $\bullet \text{---} \bullet$  Gradient de force ionique.

une allure exponentielle. Les petites fractions (figure 12) peuvent alors être séparées, en particulier de la globuline majeure.

Les pics A et B, élués pour une concentration en chlorure de sodium de 0,015 M et 0,03 M correspondent, le premier à 3 fractions catodiques, le second à 2 fractions catodiques. Les fractions anodiques mineures sont éluées pour un seuil de concentration d'environ 0,08 M. La fraction anodique majeure, apparemment homogène, est éluée pour une concentration d'environ 0,2 M. Une fraction anodique importante, de mobilité électrophorétique sensiblement identique, est éluée à plus forte concentration: 0,45 M environ. Un léger accident de la courbe constaté à forte concentration

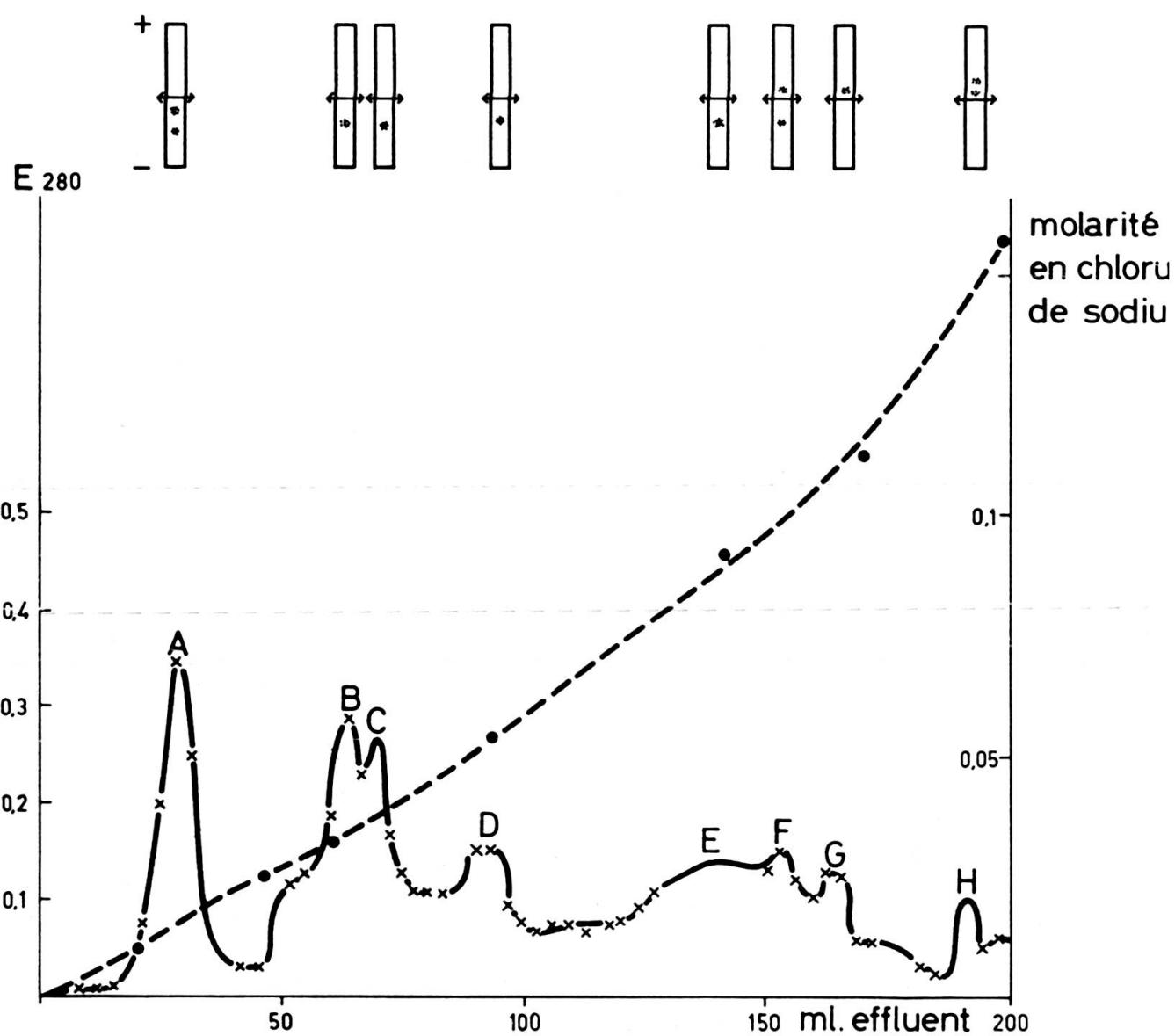


FIG. 13. — Chromatographie des globulines sur DEAE cellulose.  
Colonne: 1 cm × 18 cm. Poids de protéines appliquées: 85 mg.  
Taux de protéines récupérées: 20%. Effluent: 200 ml par fractions de 3 ml.  
Gradient de concentration saline d'allure exponentiel allant de 0 à 0,17 M.

x—x Chromatogramme.

●---● Gradient de force ionique.

saline, 0,55 M environ, semble correspondre à la fraction mineure anodique très mobile déjà mentionnée.

Un étalement encore plus large de la zone d'élution à faible force ionique (figure 13) laisse supposer que les fractions anodiques, qui sur électrophorégramme global, semblent n'être que 3, seraient en réalité plus nombreuses et de propriétés si voisines que leur déplacement de l'absorbant par le chlorure de sodium s'effectue pour des valeurs très voisines de la concentration saline.

Nous constatons ici que la transition entre l'élution des fractions anodiques et celle des fractions catodiques se produit pour une valeur de concentration saline sensiblement égale à celle observée dans la figure 2 (0,09 M environ).