

PHYSIOLOGIE ET DE
 des travaux originaux de
 revues générales», «Berichte».

titre qui donne une idée pré-
 leur rédaction de manière à ne
 feuille d'impression (16 pages).

auteurs à fournir des manuscrits
 l'action soit *in vitro* ou *in vivo*
 et les corrections, très précises.

résumé, objectif, pouvant être
 » par les organisations biblio-

de l'article sous la rubrique
 list, le titre sera « Références ».
 noms d'auteurs.

l'auteur en PETITES CAPITALES
 publication, cette parenthèse
 une fois dans le manuscrit;
 cher d'un trait ondulé); 5° pré-
 arabes ordinaires.

Physiol., 1, 1-16.

5.612

(date de publication) et l'année

fois) et l'année de publication
 paraphie. Si plusieurs travaux
 l'indication chronologique (et
 une fois) placée après l'indica-

num strictement indiqués)

carton Bristol blanc, et l'impression
 « dégradés ».

lignes, bien blanches au fond

du papier millimétré noir, ou

definitive; du papier millimétré

» peuvent accepter de publier
 nts en imprimant sur un papier
 lon scientifique est nécessaire

es au minimum. La dimension
 être indiquées dans le texte
 grande des bandes destinées

tion ainsi indiquée, pour sur-
 ion prévue dans les dimensions

les nombres décimaux des

es figures. Une seule mention
 l'actiographique sur feuille

seront réduits au minimum

données numériques, une fois

me de courbes.

COMMUNICATION BRÈVE

Reçu le 26 janvier 1957.

De quelques tests d'homogénéité appliqués à une solution
 de chitinase microbienne purifiée, par Ch. JEUNIAUX ⁽¹⁾
 (Université de Liège, Institut L. Fredericq, Laboratoires de
 Biochimie) (1 figure).

Nous avons défini (JEUNIAUX, 1955) les conditions de culture
 permettant d'obtenir des filtrats riches en chitinase et pauvres
 en matières organiques à partir d'un streptomycète chitinoly-
 tique particulièrement actif, isolé du sol (souche A 1). Nous
 avons concentré la chitinase de ces filtrats de culture par le
 procédé suivant (JEUNIAUX, 1956) :

- a) acidification du filtrat de culture, jusqu'à pH 5.2;
- b) adsorptions successives sur chitine pulvérisée, à pH 5.2 et
 à 0° C; lavage de la chitine et digestion spontanée en tampon
 acide citrique-Na₂HPO₄ 0.1 M, de pH 5.2, à 36° C (fraction
 « CD »);
- c) précipitation par le sulfate ammonique (55 % de la satu-
 ration) et solubilisation du précipité à pH 7 (fraction « SA₁ »);
- d) nouvelle précipitation fractionnée par le sulfate ammonique
 à 0° C; le précipité formé entre 30 et 50 % de la saturation
 est remis en solution dans un tampon d'acide citrique-Na₂HPO₄
 0.05 M de pH 6.2 (fraction « SA₂-50 »).

La fraction finale est 70 fois plus riche en chitinase que le
 filtrat de culture initial. Le rendement de la concentration est
 de 28 %. Cette concentration s'accompagne d'une purification
 de 9.05 fois par rapport aux protéines ⁽²⁾ et de 258 fois par

⁽¹⁾ Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

⁽²⁾ La concentration initiale en protéines, dosées par la méthode de Folin-
 Ciocalteu, varie dans une large mesure d'un filtrat de culture à l'autre. La
 purification apparente est moins spectaculaire dans le cas présent que celle
 obtenue au cours d'autres essais, à partir de filtrats 2 ou 3 fois plus riches en
 protéines (JEUNIAUX, 1956).

rapport aux protéases. D'autre part, l'activité cellulolytique du filtrat initial a été totalement éliminée.

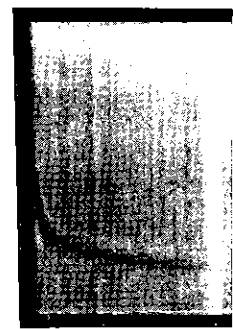
Nous avons essayé de poursuivre la purification de la chitinase par adsorption sur gel d'alumine et par fractionnement à l'éthanol. Au cours de ces essais de fractionnement, chitinase et protéines totales se sont comportées de façon identique, et il n'a pas été possible d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme.

Nous avons soumis la préparation de chitinase concentrée « SA₂-50 » aux tests d'homogénéité suivants :

1) *Solubilité en présence de sulfate ammonique en concentration croissante.* — A une solution de chitinase concentrée SA₂-50, on ajoute progressivement du sulfate ammonique en solution saturée à 0° C. On mesure la concentration de la phase liquide en chitinase et en protéines. Le logarithme de la concentration en chitinase est une fonction linéaire de la concentration molaire en sulfate ammonique, ou de la force ionique si on admet que tout le sel ajouté est ionisé. Le logarithme de la concentration en protéines non précipitées est également une fonction linéaire de la concentration en sel. Les deux droites sont parallèles. Les protéines de la solution SA₂-50 possèdent donc les mêmes propriétés de solubilité que la chitinase en présence de sulfate ammonique.

2) *Ultracentrifugation.* — La fraction purifiée SA₂-50 est dialysée pendant 18 h. à 0° C contre 2 litres de KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.05 M, de pH 7. La dialyse entraîne une légère diminution de l'activité spécifique de la chitinase. La solution dialysée, contenant 1950 Unités-chitinase/ml. et 5 mg. de protéines par ml., est soumise à l'ultracentrifugation, à l'ultracentrifuge Spinco, modèle E, à 59.780 tours/min., à la température de 21.5-22° C.

Les clichés photographiques montrent un pic d'ultracentrifugation qui reste symétrique pendant toute la durée de l'expérience (88 min.). Les protéines de la solution se comportent donc de façon homogène au point de vue de leur masse moléculaire, sans polydispersité apparente. La constante de sédimentation est de 3.42 unités Svedberg, ce qui indique, en supposant les molécules symétriques, un poids moléculaire voisin de 30.000 (fig. 1).



de la solution
à gauche : après 32 m
à droite : après 88 m

3) *Analyse électrophorétique.* — On a utilisé la méthode de GORDON *et al.* (1954) pour séparer les constituants séparés. Les protéines ont été précipitées par un moyen d'acide à 60 vol. % (URIE, 1954). La coloration permet de distinguer les constituants dans une bande en découpant la gélose dans un solvant. On mesure la concentration de la phase liquide surnageante.

A pH 7.4, en titrant la solution SA₂-50 dans le même tampon de concentration correspondante, on trouve une activité spécifique, en Unités-chitinase/mg. de protéines, approximativement identique à celle d'un peu plus basse. En mélangeant les deux solutions, on retrouve l'activité

l'activité cellulolytique du
ée.

purification de la chitinase
et par fractionnement à
fractionnement, chitinase
ées de façon identique, et
r l'activité spécifique de

de chitinase concentrée
ivants :

ammonique en concentration
ase concentrée SA₂-50, on
ammonique en solution
ration de la phase liquide
rythme de la concentration
de la concentration molaire
e ionique si on admet que
rythme de la concentration
ment une fonction linéaire
x droites sont parallèles.
possèdent donc les mêmes
ase en présence de sulfate

tion purifiée SA₂-50 est.
itres de KH₂PO₄-Na₂HPO₄.
une légère diminution de
a solution dialysée, conte-
mg. de protéines par ml.,
a l'ultracentrifuge Spinco,
température de 21.5-22° C.
ent un pic d'ultracentrifugation
toute la durée de l'expé-
a solution se comportent.
vue de leur masse molé-
La constante de sédimen-
qui indique, en supposant
ds moléculaire voisin de



FIG. 1. — Ultracentrifugation
de la solution de chitinase purifiée SA₂-50, à 59.780 tours/min.
à gauche : après 32 min. ;
à droite : après 88 min.

3) *Analyse électrophorétique en milieu gélifié.* — Nous avons utilisé la méthode d'analyse électrophorétique en gélose de GORDON *et al.* (1950) qui permet d'isoler aisément les différents constituants séparés par électrophorèse et de les caractériser. Les protéines ont été colorées par l'*Amidoschwarz* après fixation au moyen d'acide acétique 0.2 M dans de l'alcool éthylique 60 vol. % (URIEL et GRABAR, 1956). La position des bandes colorées permet de déterminer la position des différents constituants dans une gélose non fixée et non colorée, et de les isoler en découpant la gélose. Après dilacération des fragments de gélose dans un solvant au moyen d'un homogénéiseur de Potter, on mesure la concentration en chitinase et en protéines dans le liquide surnageant après centrifugation.

A pH 7.4, en tampon véronal-HCl 0.05 M, les protéines de la solution SA₂-50 migrent en masse vers le pôle négatif. A pH 8.2 dans le même tampon, les protéines se séparent en trois bandes de concentration inégale. A ces trois bandes de protéines, correspondent trois zones d'activité chitinolytique. L'activité spécifique, en Unités-chitinase par mg. de protéines, est approximativement identique dans les trois fractions, mais elle est un peu plus basse que l'activité spécifique d'une solution témoin. En mélangeant les constituants séparés par électrophorèse, on retrouve l'activité spécifique initiale.

Ces résultats suggèrent la présence de plusieurs chitinasés différant légèrement par leurs charges électriques à pH 8.2 et catalysant de façon synergique l'hydrolyse de la chitine.

En conclusion, la solution de chitinase concentrée SA₂-50 est homogène à l'ultracentrifugation et au test de solubilité en présence de sulfate ammonique. L'électrophorèse en gélose permet de séparer trois constituants, qui semblent bien être trois chitinasés différentes. L'examen quantitatif des résultats de l'analyse électrophorétique indique que cette solution de chitinase concentrée ne contient pas plus de 5 % de protéines non douées d'activité chitinolytique.

Nous désirons remercier le Dr Eugène FREDERICQ, qui a bien voulu étudier les résultats de l'ultracentrifugation, et le Dr Jacques SALMON, qui nous a aidé à réaliser les électrophorèses en gélose.

BIBLIOGRAPHIE

- GODRON, A. H., KEIL, B., SEBESTA, K., KNFESSL, O. et SORM, F. (1950). — *Coll. Trav. Chim. Tchécosl.*, **15**, 1.
 JEUNIAUX, C. (1951). — *Arch. internat. Physiol.*, **59**, 242.
 JEUNIAUX, C. (1955). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **149**, 1307.
 JEUNIAUX, C. (1956). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **64**, 522.
 URIEL, J. et GRABAR, P. (1956). — *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 427.

EXCERPT

lit tous les périodes
en langue

Sect. I	Anatomy,
Sect. II	Physiology,
Sect. III	Endocrinology,
Sect. IV	Medical Microbiology,
Sect. V	General Pathology,
Sect. VI	Internal Medicine,
Sect. VII	Pediatrics,
Sect. VIII	Neurology,
Sect. IX	Surgery,
Sect. IXB	Orthopaedics,
Sect. X	Obstetrics,
Sect. XI	Oto-Rhinology,
Sect. XII	Ophthalmology,
Sect. XIII	Dermatology,
Sect. XIV	Radiology,
Sect. XV	Chest Diseases,
Sect. XVI	Cancer,
Sect. XVII	Public Health,
Sect. XVIII	Cardiovascular,

Prospectus détaillé

Le

233-2