

THÈSES

présentées à la Faculté des Sciences de Lille

pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Gérard BISERTE

Licencié ès Sciences

Docteur en Médecine



I^{re} Thèse : Fractionnement d'hydrolysats
pepsiques de protéines

Gérard BISERTE

FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS PEPTIQUES DE PROTEINES

Travail du Service de Biochimie de la Faculté de
Médecine et de Pharmacie de Lille (Professeur Paul
BOULANGER) et de l'Institut de Recherches sur le
Cancer (Directeur : Professeur J. DRIESSENS)

1952

I

A MON MAITRE

Monsieur le Professeur BOULANGER

Membre correspondant de l'Académie de Médecine

Ces recherches ont été effectuées sous la direction de Monsieur le Professeur BOULANGER qui nous a toujours guidé avec beaucoup de bienveillance, nous prodiguant conseils et encouragements.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre très vive gratitude et de notre respectueux attachement.

II

Nous prions Monsieur le Professeur NORMANT
d'agréer nos respectueux remerciements pour l'honneur
qu'il nous fait en acceptant la Présidence de cette
Thèse

Nous remercions très sincèrement Mademoiselle
le Professeur DELWAULLE
qui sut, dès notre S.P.C.N. nous faire aimer la Chimie

Nous sommes également très heureux de trouver
dans notre Commission d'Examen, Monsieur le Professeur
DELOFFRE, qui nous a toujours réservé un accueil très
bienveillant

P R E A M B U L E

In these branches of biochemistry some of the most important problems are to isolate the substances which are responsible for a specific biological or biochemical effect (for exemple : certain enzymes) and also to define and characterize these substances as accurately as possible... But, in addition to this, fundamental problems in the chemistry of large molecules are to a high degree dependent on the development of suitable and highly specific separation methods. Each attempt to elucidate the chemical of these complex substances depends appreciably on the possibility of studying the structure of simpler fragments, which are obtained by breaking down the molecules in some way.

A. TISELIUS

- (Les Prix NOBEL 1948) -

INTRODUCTION

Le travail que nous présentons est une contribution modeste à l'étude de la structure des protéines.

Les substrats que nous avons utilisés sont bien définis, mais très complexes : "la" sérum albumine et une fraction de celle-ci, la cristalbumine.

Le mode de scission de la molécule que nous avons retenu est l'hydrolyse enzymatique par la pepsine, qui a l'avantage de découper spécifiquement la molécule et le désavantage de donner naissance à un nombre important de polypeptides de haut poids moléculaire, difficiles à séparer.

Les nombreuses méthodes que nous avons rassemblées essaient de réaliser un "fractionnement idéal" de ce mélange complexe de peptides.

Les premiers résultats que nous avons obtenus sont un encouragement à la poursuite de nos recherches dans cette voie, avec l'ensemble des techniques que nous avons mises au point.

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Pages
<u>Introduction</u>	2
<u>Chapitre A</u> : Le substrat.....	5
<u>Chapitre B</u> : Mode d'hydrolyse	10
Validité de la loi du "tout ou rien".....	11
Spécificité d'action de la pepsine	12
Poids moléculaires des produits d'hydrolyse pepsique.....	15
Conditions d'hydrolyse adoptées	17
<u>Chapitre C</u> : Les méthodes de fractionnement d'un hydro- lysate pepsique	19
I	
La chromatographie de partage	21
A) Théorie de la chromatographie	22
B) Techniques expérimentales de la chro- matographie sur papier	24
a) Applications aux acides aminés	24
b) Applications aux peptides	25
α) Chromatographie de partage des petits peptides	28
β) Chromatographie de partage des poly- peptides de poids moléculaire élevé...	45
C) Chromatographie de partage sur colonne	54
II	
La chromatographie sur résine à échange d'ions.....	60
a) Types d'échangeurs d'ions.....	60
b) Applications à la séparation des mé- langes d'acides-amino	65
c) Utilisation des résines à échange d'ions au cours du fractionnement des peptides	68

	Pages
III	
L'analyse par développement par déplacement	72
a) Principes des méthodes	72
b) Modalités d'application de la technique	73
IV	
La séparation sous l'action d'un champ électrique	77
a) Electrophorèse sur papier	78
b) Fractionnement ionophorétique dans une cellule à compartiment	81
<u>Chapitre D</u> : Essais de fractionnement d'un hydrolysats pepsique	85
I	
Etude de la fraction polypeptidiques non précipitée à la concentration de 20 p. 100 en acide trichloracétique (Filtrat F ₅)....	90
Fraction A.....	90
Fraction B	101
Fraction C	105
Fraction D	107
II	
Etude des fractions polypeptidiques précipitées à une concentration égale ou inférieure à 20 p. 100.	
a) Fractionnement ionophorétique	114
b) Hydrolyse chymotrypsique ou trypsique d'une fraction complexe	118
c) Analyse par développement par déplacement	120
Conclusions générales	125
Bibliographie	126

CHAPITRE A (*)

LE SUBSTRAT

Nous avons utilisé comme substrats la sérum-albumine de cheval ou la cristalbumine, qui en est une fraction.

I^o / - Préparation de la cristalbumine : le sérum sanguin est précipité à 52 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium neutralisé ; après une heure de contact, on centrifuge et on filtre ; on ajoute au filtrat du sulfate d'ammonium cristallisé (15 g. pour 500 ml) et on ajuste exactement à pH 4,7 par de l'acide acétique à 10 p.100. Après une nuit de contact à 5°C, on centrifuge 30 min. ; on reprend le précipité dans un volume d'eau égal à la moitié du volume de sérum dont on est parti, on précipite à 50 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium en ajustant à pH 4,8. On laisse quelques heures au repos, puis on centrifuge 40 à 60 min. à 3000 tours/minute ; on reprend le précipité dans un volume d'eau de moitié inférieur au volume précédent, on ajoute une même quantité de sulfate d'ammonium saturé et on ajuste à pH 4,9. Au bout de 24 heures, on centrifuge 60 minutes et on reprend le précipité dans quelques centimètres cubes d'eau ; on dialyse la bouillie ainsi obtenue dans un tube de cellophane, sous pression, d'abord 48 heures

(*) NOTE : Les chiffres entre crochets indiquent l'ordre d'apparition des références bibliographiques dans le texte. Les chiffres entre parenthèses renvoient aux notes situées en bas de page.

contre de l'eau courante, puis 48 à 72 heures contre de l'eau distillée. Après dialyse, on centrifuge pour enlever le précipité verdâtre qui s'est formé et qui est constitué principalement par des lipides. On dose finalement l'azote total de la solution.

2°-/ Caractéristiques physico-chimiques du substrat :

Certaines de nos préparations sont obtenues à l'état cristallisé (voir figure I). Elles sont électrophorétiquement homogènes (électrophorèse en frontières ascendantes, figures 2, 3 et 4). Toutefois, en tampon phosphate M/30 de pH 8, on peut observer dans certains cas (principalement lorsque les préparations ne sont pas cristallisées) une légère dissymétrie due à la présence d'une faible quantité d' α -globuline (voir figure 5).

Le poids moléculaire de cette protéine est de l'ordre de 65.000 (COHN [1], SCATCHARD, BATCHELDER et BROWN [2], CREETH [3], CHARLWOOD [4]).

La sérum-albumine contient, sous forme de complexes lipidoprotéiques une certaine quantité de lipides : c'est ainsi que la teneur moyenne en cholestérol de nos préparations est de 0,5 g p.100.

La composition en acides aminés, étudiée par la chromatographie bidimensionnelle des hydrolysats totaux, se caractérise essentiellement par la richesse en leucines, lysine, acide aspartique et acide glutamique. A titre de comparaison, nous avons rassemblé dans le tableau I la composition en acides aminés de la sérum-albumine de boeuf, établie par STEIN et MOORE [5] au moyen de la chromatographie de partage sur colonne d'amidon.

Les groupements aminés libres de la cristalalbumine appartiennent à l'acide aspartique (BISERTE et OSTEUX [6], voir également DESNUELLE, ROVERY et FABRE [7]). Ce résultat permet

de penser que la cristalbumine est formée soit par une seule chaîne polypeptidique terminée par un groupement α -NH₂ libre de l'acide aspartique, soit par plusieurs chaînes toutes terminées par de l'acide aspartique (I.)

En conclusion, le substrat (cristalbumine) que nous utilisons est bien défini, mais très complexe.

- (I.) - On ne peut toutefois affirmer que ces chaînes, si elles existent, sont identiques. En effet, SANGER [8] a pu déterminer que les chaînes polypeptidiques de la globine de cheval étaient terminées par de la valine. En étudiant de façon précise la composition en amino-acides de ces fins de chaîne, SANGER a pu montrer qu'il en existait au moins deux types différents, l'une comportant la séquence-valylleucine l'autre-valylglutamylleucine.

TABLEAU I

Amino-acide	g. d'acido-acide pour 100 g. de protéine	N p.100 de l'azote protéique
Phénylalanine	6,59	3,48
Leucine	12,27	8,17
Isoleucine	2,61	1,74
Méthionine	0,81	0,47
Tyrosine	5,06	2,44
Valine	5,92	4,41
Proline	4,75	3,60
Acide glutamique	16,50	9,73
Acide aspartique	10,91	7,15
Alanine	6,25	6,12
Thréonine	5,83 +	4,27
Sérine	4,23 +	3,52
Glycine	1,82	2,11
Arginine	5,90	11,80
Lysine	12,82	15,30
Histidine	4,00	6,75
Cystine + Cystéine	6,52 ‡	4,73
Tryptophane	0,58 g	0,50
NH ₃ -amidé	0,95 //	4,87
		101,2

Valeur déterminée par BRAND et col. (1944, 1946)

+ Valeurs corrigées à cause de la décomposition de ces amino-acides au cours de l'hydrolyse.

‡ Valeurs déterminées par BRAND et col. (1944-1946)

g Valeur déterminée par BRAND et col. (1944, 1946)

// Valeur corrigée en tenant compte de l'ammoniaque formé au cours de la décomposition de la sérine et de la thréonine.



FIG 1 : cristaux d'albumine (cheval).

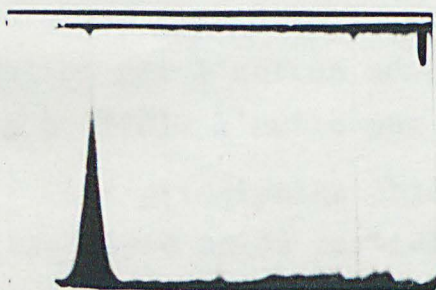


FIG 2

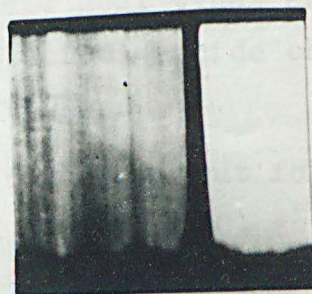


FIG 4

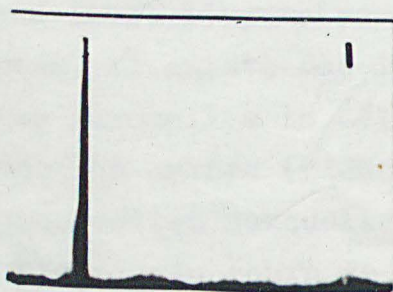


FIG 3

Diagrammes d'électrophorèse

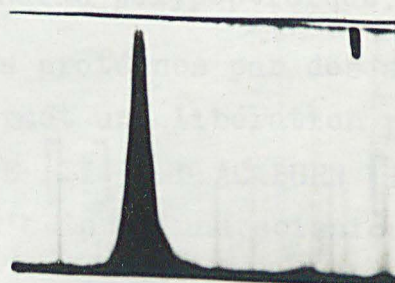
FIG 2 : pH 4,0 ;

FIG 3 : pH 7,0 ;

FIG 4 : pH 9,6

FIG 5 : pH 8,0
(hétérogénéité)

FIG 5



C H A P I T R E B

MODE D'HYDROLYSE

L'étude de la structure des protéines peut être abordée avec succès par l'identification des polypeptides résultant de leur hydrolyse partielle, dont il existe deux types essentiels, l'un réalisé par l'action ménagée des acides (acide chlorhydrique 10 N à 37°C), l'autre par les protéinases.

Les principales objections que l'on peut formuler envers l'hydrolyse acide partielle (HCl 10 N à 37°C) sont de deux ordres : tout d'abord au cours de cette opération, il se forme un très grand nombre de petits polypeptides (di - ou tripeptides. En second lieu, l'hydrolyse acide n'est pas suffisamment sélective. Certes, il existe des liaisons peptidiques plus labiles, comme celles auxquelles la sérine et la thréonine participent par leur fonction aminée (DESNUELLE et CASAL [9]), ou plus résistantes, comme celles auxquelles participent la leucine ou la valine (SYNGE [10]). Au cours de l'action de l'acide, la "nature" des liaisons peptidiques semble donc conditionner partiellement leur rupture ; par contre, leur "position" a relativement peu d'importance, ce qui peut se concevoir aisément si l'on considère que les faibles dimensions de l'ion H^+ lui permettent d'aborder facilement tous les points de la chaîne polypeptidique.

L'hydrolyse ménagée des protéines par des acides dilués (HCl N/10, SO_4H_2 N/10), qui permet une libération préférentielle d'acide aspartique, (PARTRIDGE [11], BLACKBURN [12], BISEAU et PIGACHE [13]), permet déjà d'obtenir une scission plus sélective.

tive de la molécule.

Au cours de l'hydrolyse enzymatique par les protéinases, les facteurs "position" et "nature" des liaisons peptidiques interviennent tous deux d'une façon significative. Dès lors, ce mode d'attaque de la molécule semble plus favorable, d'autant plus que, pour de nombreuses protéines, l'action des endopeptidases s'effectue suivant une loi du "tout ou rien" (TISELIUS [14]) : c'est-à-dire que les molécules protéiques sont dégradées "complètement" les unes après les autres et que, par suite, les produits initiaux et terminaux d'hydrolyse sont identiques. Deux endopeptidases peuvent être utilisées, la pepsine et la chymotrypsine (2.)

Les résultats que nous rapportons dans ce travail, ont été obtenus uniquement au cours de l'hydrolyse pepsique de la sérum-albumine.

Remarques sur le mode d'attaque de la sérum-albumine par la pepsine

a) Validité de la "loi du "tout ou rien"."

En accord avec cette règle, la sérum-albumine est bien transformée en polypeptides sans que l'on puisse mettre en évidence de produits intermédiaires. Lorsqu'on soumet à l'électrophorèse différentielle ces produits d'hydrolyse, on peut identifier plusieurs fractions ayant des mobilités différentes. A pH 5,9, on décèle 9 fractions probablement complexes, qui se répartissent en 3 groupes que nous avons qualifiés respectivement de "basique", "neutre" et "acide". Au cours des premiers stades de l'action enzymatique, cette étude électrophorétique nous montre uniquement des variations quantitatives de ces diverses fractions : ce qui est en accord avec la règle du "tout ou rien" (figure 6 et 7).

(2.) - La trypsine est sans action sur la cristalalbumine native,

Toutefois, ainsi que l'ont montré DESNUELLE [15] et MORING-CLAESSON [16] pour l'ovalbumine, après ce stade initial de dégradation rapide, les gros peptides primitivement formés semblent subir une dégradation lente qui les transforme en tri- ou tétrapeptides. Nous avons également constaté que les diagrammes d'électrophorèse d'hydrolyses pepsiques prolongées (48 h.) se simplifiaient notablement par suite de la formation de petits peptides qui possèdent des comportements électrophorétiques assez voisins. (voir figures 8 et 9)

3) - Spécificité d'action de la pepsine.

FRUTON et BERGMANN [17], à l'aide de substrats synthétiques, ont démontré que la pepsine rompt préférentiellement la liaison peptidique formée par un groupement aminé appartenant à un acide aminé aromatique (tyrosine ou phénylalanine) et par un carboxyle provenant d'un acide aminé quelconque, mais de préférence toutefois, de l'acide glutamique.

Exemple : carboxy-L-glutamyl-L-tyrosine.

Cependant, il ne semble pas, comme l'avait cru BERGMANN, que l'on puisse en déduire une loi générale de spécificité d'action de la pepsine sur les peptides ou les protéines. HARRINGTON et PITT-RIVERS [18] ont d'ailleurs démontré qu'un dipeptide, comme la tyrosylcystéine, qui contient une amino-acide aromatique du côté carboxylique de la liaison peptidique, est hydrolysé par la pepsine.

Les travaux récents de SANGER et TUPPY [19] sur les hydrolysats pepsiques de chaînes polypeptidiques de l'insuline oxydée, ont permis d'élargir sérieusement la spécificité d'action de la pepsine :

a) L'action enzymatique peut porter des deux côtés des

résidus d'acides aminés aromatiques.

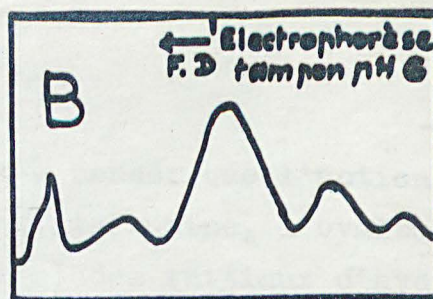
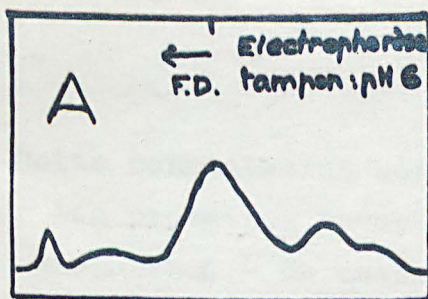
Exemple : - PHE - PHE - TYR -
 ↑ ↑

b) De plus, l'action n'est pas toujours limitée aux liaisons adjacentes aux acides aminés aromatiques ; des enchaînements comme - leu - val - ou - ala - leu - peuvent être scindés. Il en est de même pour la séquence - glutaminyl-histidine.

Donc, en conclusion, la pepsine possède une spécificité d'action assez large, beaucoup plus large en tout cas que celle de la chymotrypsine et de la trypsiine ; elle scinde toutefois de préférence des liaisons adjacentes aux résidus de leucine, tyrosine et phénylalanine.

L'étude des DNP-peptides (3.) des hydrolysats peptiques d'ovalbumine, de cristalline et de γ - globulines, qui nous permet d'étudier la spécificité de la pepsine du côté aminé de la liaison peptidique, nous a permis de conclure à une homogénéité d'action dans l'attaque de ces diverses protéines (BISERTE et OSTEAU [20]). On identifie, en effet, les mêmes DNP-aminoacides éthersolubles, en proportions d'ailleurs comparables, dans les divers hydrolysats peptiques de protéines différentes. (figure 10).

(3.) - Après traitement par le dinitro-fluorobenzène (DNFB) des hydrolysats enzymatiques, les DNP-peptides ainsi obtenus peuvent être séparés en 3 fractions principales par extraction avec l'acétate d'éthyle (Fraction I) et avec le butanol (Fraction II). Le précipité restant en suspension dans la phase aqueuse après deux extractions constitue la Fraction III. Les fractions I, II et III de DNP-peptides ainsi séparées sont hydrolysées par HCL 5,6 N pendant 7 heures à 100°C. Finalement, de ces hydrolysats, on peut extraire les DNP-aminoacides éthersolubles qui proviennent donc des acides aminés qui possédaient un groupement α -NH₂ libre au bout de la chaîne polypeptidique.



Temps d'hydrolyse: A = 1 heure 30 ; B = 7 heures

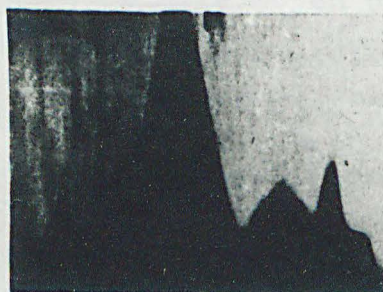
Température : 31°C - pH = 2,02

Rapport enzyme/substrat = 1/166.

FIG 6

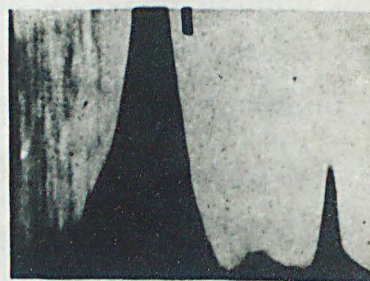
FIG 7

VARIATIONS QUANTITATIVES EN FONCTION DU TEMPS



B₄ B₃ B₂ B₁ N δ A₄ A₃ A₂ A₁
Ac

F.A.I. →



B₃ B₁ N δ A₃ A₄ A₂ A₁
Ac

F.A.I. →

FIG 8 (1 heure 30)

FIG 9 (48 heures)

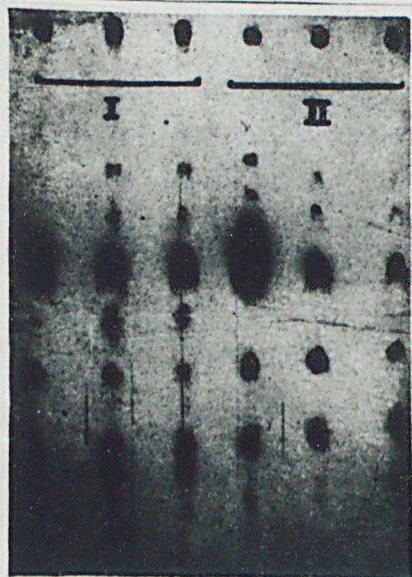


FIG 10 -

FIG. 8 et 9 =
SIMPLIFICATION DES
Diagrammes d'électrophorèse
au cours des hydrolyses pepsiques
"PROLONGEES" (FIG 9).

FIG 10 = IDENTITE dans le
comportement chromatographique
des DNP-aminoacides des diverses
fractions (voir note 3.) de DNP-peptides
résultant de l'hydrolyse pepsique
de cristalline (I) et de γ -globulines
(II).

Cette constatation conduit à penser que l'action de la pepsine sur les protéines comme la cristalbumine, l'ovalbumine et les γ -globulines, - du moins aux stades initiaux d'hydrolyse, - s'effectue en des points précis de la molécule.

γ) - Poids moléculaire des produits d'hydrolyse pepsique

La loi du "tout ou rien" n'étant pas toujours entièrement valable dans le cas de l'hydrolyse pepsique, il est évident que le poids moléculaire moyen des peptides libérés dépend des conditions d'hydrolyse : les différents facteurs variables étant le pH, la température, la quantité d'enzyme, le temps d'hydrolyse.

CURRIE et BULL [21] ont démontré que les peptides résultant de l'hydrolyse pepsique de l'ovalbumine peuvent être divisés en deux grandes fractions : l'une dont le poids moléculaire est voisin ou inférieur à 2000, l'autre consistant en de gros fragments de poids moléculaire de l'ordre de 30.000 (figure II). Les conditions qui favorisent l'accumulation des peptides de faible poids moléculaire sont :

- 1) des valeurs de pH voisines de 2 ou légèrement supérieures ;
- 2) une température assez basse, aux environs de 30°C ;
- 3) des quantités importantes de pepsine (rapport enzyme/substrat = I/I66)

Inversement les conditions qui favorisent l'accumulation des peptides de haut poids moléculaire sont :

- 1) des valeurs basses de pH (1,5) ;
- 2) des températures plus élevées ;
- 3) des quantités plus faibles de pepsine.

L'étude électrophorétique de ces deux modalités d'hydrolyse pepsique nous a permis de mettre en évidence des différences remarquables dans la complexité des diagrammes (figure I2 et I3).

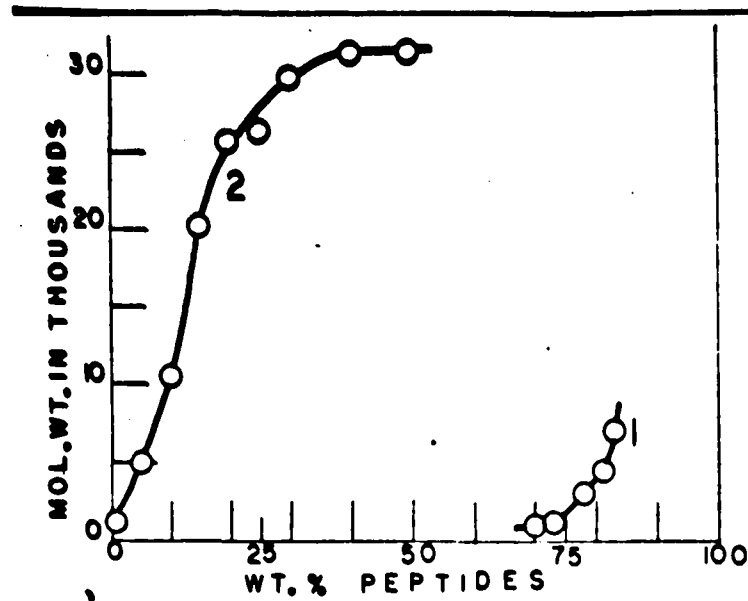
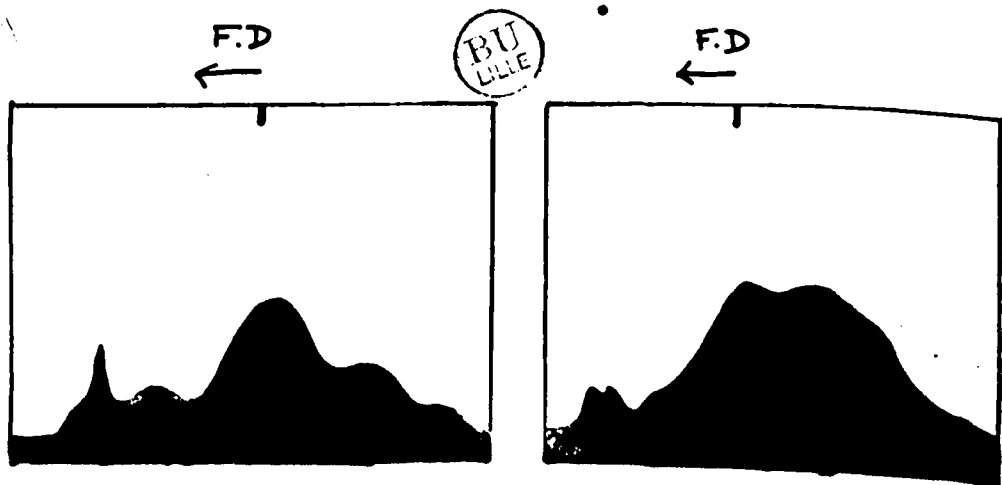


FIG 11

Mesure du poids moléculaire des peptides
d'un hydrolysât pepsique (d'après CURRIE et BULL)
courbe 1 : avant précipitation trichloracétique
courbe 2 : après " " " "



Diagrammes d'électrophorèse
d'un hydrolysât pepsique (tampon pH 6)
FIG 12 FIG 13

↓
accumulation de
"petits peptides"

Conditions expérimentales
de CURRIE et BULL

↓
accumulation de
"gros peptides"

8) Conditions d'hydrolyse adoptées.

Au cours du travail que nous présentons, les deux types suivants d'hydrolyse pepsique ont été employés :

Type n° 1 - la cristalbumine (ou la sérum-albumine), électrophorétiquement homogène, est hydrolysée 5 heures à 37°C dans l'acide chlorhydrique N/10 par la pepsine cristallisée à la concentration de 1/300. L'activité de la pepsine est ensuite inhibée par chauffage pendant 3 minutes à 80°C, puis l'hydrolysate est dialysé à 5°C contre 500 ml d'eau distillée, qui sont renouvelés quotidiennement pendant 10 jours. Les liquides de dialyse (4.) sont concentrés séparément sous pression réduite à une température qui n'excède pas 35° à 40°C. Finalement, les résidus sont desséchés sous pression réduite en présence de potasse caustique pendant 8 jours, puis finalement pulvérisés.

Type n° 2 - la cristalbumine est hydrolysée pendant 4 heures à 30°C à pH 2,1 par la pepsine cristallisée à la concentration de 1/166. Après ajustement à pH 4,8 de l'hydrolysate, la protéine restante est précipitée par chauffage à 100°C. Après filtration, l'hydrolysate est soumis à un fractionnement trichloracétique (voir page 85)

Les résultats fournis par ces deux types d'hydrolyse ne sont pas entièrement comparables. D'une part, les conditions d'hydrolyse sont différentes. D'autre part, le "mode de préparation

- (4.) - Au cours de l'évaporation des premiers liquides de dialyse - qui contiennent une faible quantité d'acide chlorhydrique - il peut se produire une hydrolyse partielle de polypeptides avec libération d'acides-amino. Il n'y a aucun inconvénient à neutraliser ces premiers dialysats, car le fractionnement ultérieur de ces polypeptides (électrodialyses ou chromatographie sur résines à échange d'ions) permet d'éliminer le sel neutre ainsi formé.

des polypeptides est également différent : dialyse dans un cas, précipitation trichloracétique dans l'autre. Or, ANFINSEN [21bis] , a montré qu'en partant d'un hydrolysât pepsique dont le poids moléculaire moyen des polypeptides correspond à des octopeptides, le dialysat est constitué principalement par des tétrapeptides, tandis que la fraction non dialysable comprend surtout des undécapeptides.

En conclusion, l'hydrolyse pepsique paraît assez spécifique. Elle se fait en plusieurs stades : un stade de rupture en "gros fragments" (poids moléculaire de 30.000 dans le cas de la cristalbumine et de l'ovalbumine), suivi d'une hydrolyse "explosive" suivant la loi du "tout ou rien". De toute façon, elle permet l'accumulation de peptides dont le poids moléculaire moyen correspond à des octopeptides, dont la structure pourra être déterminée.

CHAPITRE C

LES METHODES DE FRACTIONNEMENT D'UN HYDROLYSAT ENZYMATIQUE

"Nous avons un grand besoin de méthodes devant être à la fois douces et efficaces et en outre fortement spécifiques".

A. TISELIUS - Estratto dai Rendiconti
de II' Istituto superiore di Sanità -
Volume XIV, 1950 -

La méthode d'hydrolyse pepsique nous apparaît donc parfaitement utilisable. La seule objection importante que l'on puisse retenir envers elle est la possibilité d'une "resynthèse" protéique à partir des polypeptides primitivement formés. Mais il paraît actuellement bien démontré, comme le dit justement DESMUELLE [22], que "le danger présenté par ces phénomènes parasites de synthèse ne doit pas sérieusement arrêter les expérimentateurs, à condition bien entendu qu'ils travaillent pendant des temps raisonnables avec des protéines et des enzymes parfaitement purifiés" (cf. également BUTLER et coll [23]).

Il reste à résoudre la question du fractionnement du mélange peptidique obtenu, question qui a déjà été abordée de plusieurs façons.

Certains auteurs ont utilisé une seule technique de séparation (analyse frontale d'adsorption, MORING - CLAESSON [24] - chromatographie de partage, PHILLIPS [25], FIDIAN [26]). Au cours

de nos recherches, nous avons rapidement constaté, dans le cas de mélange provenant de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat complexe, que l'emploi d'un seul procédé de séparation ne nous permettrait pas d'arriver au stade idéal de fractionnement total en polypeptides "purs". D'ailleurs SANGER et TUPPY [27] (hydrolyse enzymatique de l'insuline oxydée), LI et TISELIUS [28] (hydrolysats peptiques de l'ACTH) ont également fait cette remarque et ont couplé de nombreuses méthodes de fractionnement.

En associant judicieusement des techniques fondées sur des principes très différents, il est possible d'obtenir une séparation poussée. Mais avant d'envisager ce problème général (chapitre D), il nous paraît indispensable de préciser les conditions d'application particulières de chaque procédé, conditions que nous avons été amené à adapter aux différents problèmes posés.

Les méthodes de fractionnement que nous allons passer en revue se classent sous les rubriques suivantes :

- 1) - La chromatographie de partage (sur papier et sur colonne)
- 2) - la "chromatographie" sur résines à échange d'ions
- 3) - l'analyse par développement par déplacement
- 4) - la séparation sous l'action d'un champ électrique (électrophorèse sur papier, électrodialyse ...).

I) - LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

Le "nouveau type de chromatogramme utilisant deux phases liquides" qui a fait l'objet d'une publication de MARTIN et SYNGE [29] en 1941, est devenu rapidement le point de départ de nombreuses recherches et a conduit notamment à la mise au point de la méthode remarquable de la microchromatographie sur papier due à CONSDEN, GORDON et MARTIN [30]. Contrairement à la chromatographie classique dérivant de la théorie de TSWETT, cette méthode ne fait pas appel à des phénomènes d'adsorption sélective sur des substances pulvérulentes, mais au "partage" des corps à séparer entre deux solvants dans lesquels leurs solubilités sont inégales. Elle se rapproche donc du procédé dit d'extraction à contre-courant, où deux phases liquides peu ou non miscibles circulent en sens inverse, les substances dissoutes dans l'une étant extraites par l'autre d'autant plus facilement que leur solubilité dans ce second solvant est plus grande. Dans la chromatographie de partage, l'artifice expérimental consiste à remplacer les deux phases mobiles par une phase stationnaire, retenue sur un support inerte (gel de silice, amidon, kieselguhr, papier-filtre, etc...) et une phase mobile. Dans la chromatographie sur papier, c'est l'"humidité" du papier-filtre qui joue le rôle de phase stationnaire, la phase mobile étant représentée par le solvant organique qui imbibe progressivement le papier par capillarité. La séparation des substances dissoutes, qui se traduit par une position particulière sur la colonne ou la bande de papier, dépend uniquement de leur coefficient de partage entre les deux phases liquides.

Théoriquement, on peut assimiler la colonne à chromatographie à une colonne de distillation du type continu, qui peut

être divisée en un grand nombre de plateaux théoriques. En partant de ce concept, il est possible d'établir une formule dans laquelle le déplacement d'une substance est relié à la valeur du coefficient de partage entre les phases stationnaire et mobile (CONSDEN, GORDON et MARTIN [31]). Habituellement, la phase stationnaire est aqueuse, tandis que la phase mobile est constituée par un solvant organique. On peut toutefois réaliser des séparations à phases inversées en utilisant un solvant organique pour la phase stationnaire, avec comme phase mobile de l'eau ou un solvant hydrophile, la phase organique étant fixée sur un support inerte hydrophobe (papier siliconé ou kieselguhr siliconé (PARTRIDGE [32], TISELIUS [33], MARTIN [34])).

A) THEORIE DE LA CHROMATOGRAPHIE

a) Notion de R_F : En chromatographie, on peut suivre la séparation en observant le liquide qui s'écoule au bas de la colonne. Il est cependant plus commode (notamment en chromatographie sur papier) de définir la position d'une zone au cours de l'opération par le rapport entre les distances parcourues par la zone et par le solvant pur : c'est la valeur R_F introduite par MARTIN et SYNGE [35].

$$R_F = \frac{\text{déplacement de la bande du corps dissous}}{\text{déplacement du front du liquide}}$$

b) Théorie :

soit A = surface de la section transversale de la colonne
 A_S = surface de la section transversale de la phase stationnaire.
 A_L = surface de la section transversale de la phase mobile.
 A_I = surface de la section transversale du solide inerte.

$$A = A_S + A_L + A_T$$

soit C la concentration du composé dans la phase mobile
(g. de corps dissous par litre de phase mobile)

C_I la concentration du composé dans la phase stationnaire
(g. de corps dissous par litre de phase stationnaire)

le coefficient de partage α est $\frac{C_I}{C}$.

MARTIN et SYNGE [36] ont démontré que :

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$$

Le R_F dépend donc du coefficient de partage α du composé entre les phases mobile et stationnaire et du rapport des volumes des deux phases mobile et stationnaire dans le chromatogramme. Le rapport $\frac{A_L}{A_S}$ peut être considéré comme constant si le papier est uniforme dans sa texture, son épaisseur et sa capacité de fixation d'eau.

En conséquence, les zones migrent donc sur le chromatogramme sans étallement appréciable et leurs positions sont bien définies et reproductibles.

Pour les acides aminés, les valeurs des coefficients de partage obtenus par mesures directes et celles calculées à partir des R_F observés sont tout à fait comparables. Toutefois, pour d'autres composés, il n'y a pas toujours de correspondance précise entre ces deux valeurs, peut-être parce que l'eau retenue dans la phase stationnaire n'est pas tout à fait assimilable à de l'eau "libre" et parce que des phénomènes d'adsorption peuvent se produire sur le support idéalement inerte de la phase stationnaire. Il est certain, d'autre part, que l'utilisation de solvants organiques entièrement miscibles à l'eau, notamment au cours de la chromatographie des acides aminés, remet en question l'inter-

.....

prétation que CONSDEN et coll. ont donné du mécanisme de la séparation chromatographique et nécessite une conception théorique plus large (HANES et ISHELMWOOD) [37] .

B) TECHNIQUE EXPERIMENTALE DE LA CHROMATOMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER

a) Application aux acides aminés. - L'application de cette technique aux amino-acides est maintenant classique. Nous ne décrirons pas le matériel, d'ailleurs relativement simple, nécessaire à la chromatographie de partage sur papier et nous ne donnerons uniquement que quelques indications techniques susceptibles d'être utiles aux expérimentateurs. Pour de plus amples détails, nous renvoyons aux revues générales de BOULANGER et BISERTE [38] et de CLEGG [39] . Le choix du papier a une importance considérable. Pour les amino-acides, nous utilisons exclusivement le papier Whatman n° 1. Les chromatographies bidimensionnelles sont effectuées avec le mélange butanol/acide acétique/eau (4:1:5) (PARTRI-GE [40] comme premier solvant (5.) et le phénol (NH_3 0,3 ou 3 % en présence de KCN) (6.).

La figure 14 donne la carte des acides aminés et de leurs dérivés dans les systèmes-solvants que nous utilisons ha-

.....

- (5.) - La valeur de RF dans le butanol/ac. acétique sont assez variable suivant le vieillissement du système-solvant : ces variations dépendent vraisemblablement du degré d'estérification du butanol. Nous préparons habituellement le butano-
acide acétique 2 à 3 heures avant son utilisation.
- (6.) - Le phénol est saturé avec de l'eau. Un litre de solution aqueuse d'ammoniaque (0,3 ou 3 % (poids/volumes)) est placé dans le fond de la chambre chromatographique. On ajoute en outre à cette solution une petite quantité de KCN.

bituellement. Le tableau II rassemble les valeurs de R_F de ces composés.

La chromatographie de partage des amino-acides est une technique simple, précise et sensible. Les précautions indispensables à observer au cours de sa réalisation sont :

a) la constance de la température du laboratoire où s'effectue la chromatographie (température optima : + 20°C).

c) la déminéralisation parfaite des hydrolysats totaux. Il est donc nécessaire d'enlever toute trace d'HCl par des évaporations sous vide très soignées et même, dans de nombreux cas, d'opérer une déminéralisation sur des microcolonnes de résine à échange de cations (type résine polystyrène-sulfonée : Permutite 50). De telles résines retiennent tous les amino-acides, qui peuvent être quantitativement déplacés par l'ammoniaque diluée. Les anions et les impuretés d'autre nature ne sont pas retenues et sont donc éliminées.

b) Application aux peptides :

La chromatographie de partage sur papier s'applique également à la séparation des polypeptides. Toutefois, les résultats obtenus sont de valeurs très inégales suivant la nature des composés étudiés. Dans la série des peptides, il nous apparaît que la "qualité" de la séparation est fonction non seulement de la sensibilité des réactions d'identification, mais surtout de la complexité structurale des composés étudiés - qui est en relation directe avec le poids moléculaire - et aussi de la nature du support inerte. En tenant compte de ces considérations, nous envisagerons successivement :

α) la chromatographie sur papier des "petits peptides"
(principalement di-, tri - et tétrapeptides ;

β) la chromatographie des peptides de poids moléculaire

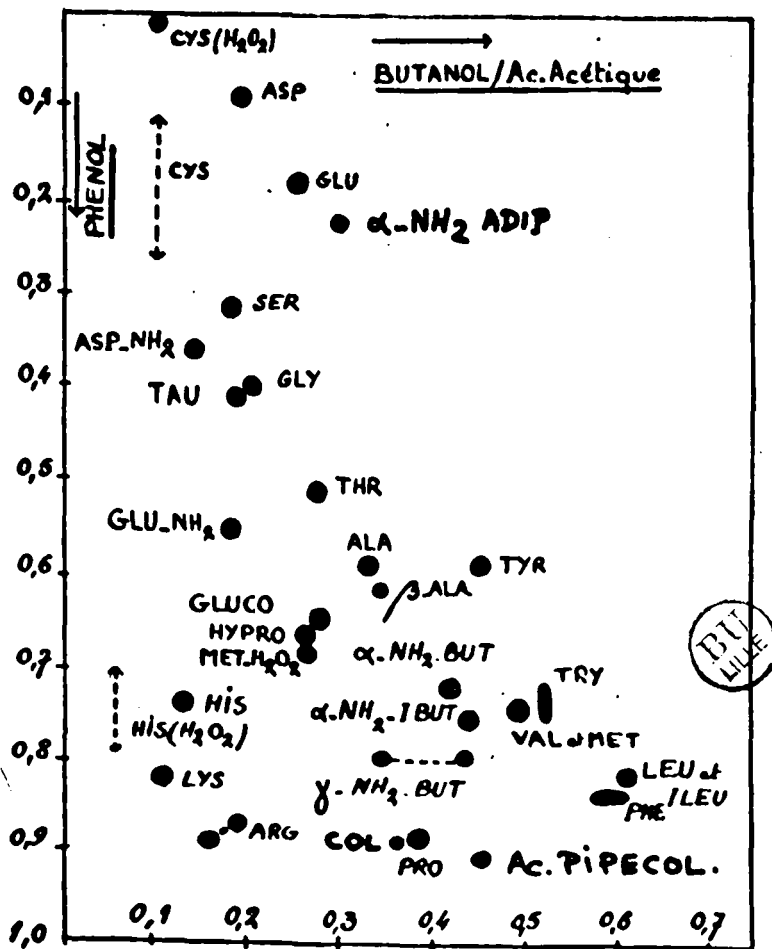


FIG. 14

Carte des acides aminés dans le système phénol-NH₂ et butanol-acide acétique-eau.

FIG. 14

TABLEAU II

Valeurs de R_p des Amino-acides et de leurs dérivés

Amino-acides ou dérivés	Phénol (NH_3 3 p. 100)	Méthanol/Acide Acétique
Acide aspartique	0,09	0,19
Acide glutamique	0,18	0,25
Acide α -amino-adipique	0,22	0,30
Sérine	0,31	0,18
Glycocolle	0,40	0,20
Taurine	0,41	0,18
Asparagine	0,35	0,14
Thréonine	0,50	0,27
Alanine	0,58	0,32
Glutamine	0,55	0,18
Tyrosine	0,58	0,45
β -alanine	0,62	0,34
Valine et Méthionine	0,74	0,49
Méthionine-sulfone	0,68	0,26
Méthionine-sulfoxyde	0,80	0,25
Tryptophane	0,74	0,52
Leucine - Isoleucine	0,80	0,60
Phénylalanine	0,85	0,58
Ornithine	0,70	0,12
Histidine	0,73	0,13
Lysine	0,81	0,10
Arginine	0,88	0,17
Acide γ -aminobutyrique	0,79	0,43
Proline	0,87	0,38
Hydroxyproline	0,63	0,23
Glucosamine	0,66	0,16
Colamine	0,87	0,38
Phosphocolamine	0,30	0,07-0,13
Acide β -aminoisobutyrique ou α -méthyl- β -Alanine	0,75	0,42
Acide α -aminobutyrique	0,72	0,38
Acide α -aminoisobutyrique	0,72	0,38
Acide δ -aminovalérique	0,78	0,48
Acide α -aminocaproïque	0,81	0,62
Acide ϵ -aminocaproïque	0,84	0,54
Acide pipécolinique	0,88	0,44
Acide cystéique	0,05	0,05
Lanthionine	0,32	0,05
Acide djenkolique et cystathionine	0 à 0,32	0 à 0,05
Dihydroxyphénylalanine	0,25	0,27

plus élevé (hexa-, hepta- et octopeptides).

Nous nous étendrons plus longuement sur les modalités d'application de la chromatographie sur papier aux polypeptides, car il s'agit d'une technique beaucoup plus délicate que dans le cas des acides aminés.

α) - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER DES "PETITS PEPTIDES"

I2) - Techniques - La technique chromatographique est exactement celle qui a été décrite pour l'étude des amino-acides. Il est particulièrement recommandé d'effectuer les chromatographies dans une chambre à température constante (20°C). L'emploi du papier Whatman n° 1 ou n° 4 est ici encore préférable (7.). La quantité minima à mettre en oeuvre est de l'ordre de 10 à 20 μ g pour chaque peptide. Les systèmes-solvants les plus sélectifs sont le phénol (NH_3 0,3 ou 3 p.100 en présence de HCN), la collidine, le système n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), le système n-butanol/acide formique/eau (75:15:10) en présence de HCN (ACHER, JUTISZ et FROMAGEOT [41]), le m-crésol (NH_3 0,03 p.100) (SANGER [42]), le système pyridine/alcool isoamylique (EDMAN [43]), le système n-propanol/eau (80:20) (HANES [44]).

Le meilleur système-solvant est, à notre avis, le mélange butanol/acide acétique. Accessoirement, dans certains cas particuliers, il peut être intéressant d'utiliser l'alcool benzylique et l'alcool amylique tertiaire (2-méthylbutane-2-ol)

(7.) - Des papiers plus épais : Whatman n° 3 et surtout Munktell n° 20/150 (GRYCKSBO-PAPPERSBRUCK, Sweden), peuvent être employés pour les chromatographies séparatives.

(cas des peptides "neutres"), l'alcool benzylique additionné de 4 p.100 d'acide formique (MONIER et FROMAGEOT [45]), le mélange alcool benzylique/*n*-butanol/acide acétique (20:20:8) (BOULANGER et BISCHTE [46]).

La chromatographie bidimensionnelle peut être effectuée avec deux couples de systèmes-solvants, de la manière suivante :

a) phénol ou crésol comme premier système-solvant et butanol/acide acétique dans la seconde dimension ; il est parfois utile de "prolonger" le passage du butanol acétique, soit en laissant s'écouler librement le solvant à l'extrémité de la feuille, soit en fixant une seconde feuille de papier-filtre au bas de la première.

b) butanol/acide formique ou butanol/acide acétique en première dimension et phénol (NH_3) en seconde dimension.

Personnellement, nous utilisons, suivant les cas, les deux combinaisons, car leurs pouvoirs résolutifs ne sont pas superposables. Il faut signaler que la combinaison (a) donne plus fréquemment lieu à des effets de traînée, tandis que la combinaison (b) conduit à des spots plus compacts, mais malheureusement plus difficilement repérables en lumière ultra-violette (8.)

Après développement par ces systèmes-solvants et séchage prolongé à l'étuve à 90-100°C pendant 10 à 20 minutes, le

(8.) - SANGER [47] signale également cette difficulté de repérage avec la combinaison (b). Cet auteur conseille d'ailleurs d'éviter tout contact avec les vapeurs de phénol au cours du séchage dans l'étuve si l'on veut observer une fluorescence nette. Il est curieux de constater également que la fluorescence dépend dans une certaine mesure du lot de papier utilisé (JONES [48]).

repérage des taches peut être effectué par examen en lumière de WOOD (PHILLIPS [49]) et la révélation par pulvérisation d'une solution de ninhydrine suivie d'un chauffage à l'étuve à 90-100°C pendant 5 à 10 minutes (9.).

Dans certains cas particuliers, on peut avoir recours à des révélations spéciales. Ainsi, pour les peptides contenant de l'histidine (comme pour l'histidine) on peut se servir du réactif suivant (SANGER [51]) : un mélange à parties égales de p-anisidine à 1 p.100 (poids/volume) dans l'éthanol chlorhydrique (0,11 N en HCl) et de nitrite d'anyle à 10 p.100 (en volumes) dans l'éthanol est pulvérisé sur le papier ; après séchage à l'air, la coloration est développée soit par des vapeurs d'ammoniaque, soit par pulvérisation de potasse alcoolique ; l'histidine et les peptides contenant cet amino-acide donnent une tache rouge intense, tandis que la tyrosine donne une faible coloration orangée.

2°) - Comportement chromatographique des petits peptides. - Quelques unes des valeurs de R_F de peptides de synthèse dans divers solvants, données par CONSDEN, GORDON et MARTIN [52] sont rassemblées dans le tableau III.

De même, KNIGHT [53] a étudié les peptides (dipeptides à octopeptides) synthétisés il y a une cinquantaine d'années par E. FISCHER (10.) dans les systèmes-solvants phénol/eau (80:20) en présence de HCN et pyridine/alcool isomyle. Quelques-uns des chiffres obtenus sont reproduits dans le Tableau

(9.) - Pour la révélation à la ninhydrine, le temps de chauffage doit être plus long que dans le cas des amino-acides et il y a avantage à "interpréter" les chromatogrammes 24 à 48 heures après la révélation. Il faut noter que certains spots de peptides changent de coloration ; ainsi les peptides contenant du glycécolle passent du jaune orangé au violet (CONSDEN [50]).

(10.) - Signalons que tous ces peptides de synthèse étaient "chromatographiquement" purs.

TABLEAU III

(d'après CONSDEN)

R_F de quelques peptides dans différents solvants sur papier Whatman n° 4

	Phénol [Gaz d'éclairage 0,3 % NH ₃ (1.)]	S-collidine	m-crésol 0,1 % cupron 3 % NH ₃ (1.)
Glycyl-DL-alanine	0,63	0,32	0,29
Glycyl-DL-leucine	0,79	0,53	0,66
DL-alanyl-L-glycine	0,65	0,32	0,29
L-alanylglycylglycine	0,63	0,46	0,29
DL-valylglycine	0,73	0,53	0,48
DL-leucyl-DL-leucine	0,84	0,89	0,85
L-prolylglycine	0,68	0,49	0,55
L-tyrosylglycine	0,59	0,95	0,33

(1.) - Solution d'ammoniaque placée au fond de la cuve.

TABLEAU IV

(d'après KNIGHT)

R_F de quelques peptides sur papier Whatman n° 1 à 25°C

	Phénol/eau	Pyridine/alcool isoamylique
Glycyl-L-acide aspartique	0,09	0,04
L-séryl-L-sérine	0,25	0,11
L-leucyl-L-acide aspartique	0,37	0,11
L-leucyl-L-acide glutamique	0,48	0,12
DL-leucyl-DL-alanine	0,82	0,37
Leucylalanylglycine	0,86	0,28
DL-leucylglycyl-DL-alanine	0,87	0,29
DL-leucyldiglycylglycine	0,90	0,24
L-alanyldiglycyl-L-alanylglycylglycine	0,94	0,09
L-prolyl-L-phénylalanine	0,97	0,39

IV.

Notons que les R_F des peptides peuvent varier assez fortement d'un essai à un autre suivant les conditions expérimentales. Ils sont notamment très sensibles aux variations de pH.

L'examen de ces résultats permet d'envisager l'influence de la constitution des peptides sur le comportement chromatographique.

Si le groupement carboxylique libre joue certainement un rôle (exemple de KNIGHT : triglycylglycine $R_F = 0,57$ et acide de triglycylglycine $R_F = 0,82$), c'est surtout le groupement aminé libre qui semble conditionner la valeur du R_F :

Exemple :

R_F (collidine) de la leucylglycine : 0,61 (CONSDEN) [54]
 R_F (collidine) de la leucine : 0,58 -
 R_F (collidine) du glycocolle : 0,25

R_F (phénol/eau) de la leucylalanine : 0,82 (KNIGHT) [55]
 R_F (phénol/eau) de la leucine : 0,82 -
 R_F (phénol/eau) de l'alanine : 0,59 -

Il ne s'agit toutefois pas d'une règle exclusive : on constate en effet une concordance assez étroite entre les R_F de dipeptides constituées par des amino-acides identiques mais engagés différemment dans les liaisons peptidiques.

Exemple :

- Glycylalanine : $R_F = 0,64$ (phénol, cupron) et 0,32 (collidine) (CONSDEN) [56]
- Alanyl-glycine : $R_F = 0,60$ (phénol, cupron) et 0,32 (collidine) (CONSDEN) [56]
- Glycylleucine : $R_F = 0,72$ (phénol, eau) et 0,29 (pyridine-alcool (isomérique) (KNIGHT) [57]
- Leucylglycine : $R_F = 0,78$ (phénol, eau) et 0,31 (pyridine-alcool

On peut dire que les peptides, malgré l'influence prédominante du groupe aminé libre, ont un R_F moyen compris entre ceux des acides aminés qui les composent. PARDEE [58], s'inspirant de la théorie de MARTIN [59], a pu établir une formule de calcul du R_F théorique d'un peptide, qui tient compte à la fois du R_F particulier des deux amino-acides dans le système-solvant utilisé et de deux constantes que l'on peut déterminer expérimentalement (voir également COOK et LEVY [60]):

$$R_F \ln(1/R_F - 1)_P = (n-1)A + B + \sum R_F \ln(1/R_F - 1)_{AA}$$

P = peptide contenant n amino-acides (AA)

A et B = constantes déterminées expérimentalement

Par comparaison avec les données expérimentales de KNIGHT (voir plus haut), on voit que la formule de PARDEE permet de déterminer le R_F avec une approximation de $\pm 0,05$ (voir Tableau V).

Il existe cependant des cas où l'erreur obtenue est plus importante (erreur plus grande que 0,15 dans 9 cas sur 63 peptides étudiés). L'erreur la plus importante est de 0,24. Dans certains cas cette méthode peut d'autre part fournir des renseignements sur le poids moléculaire d'un peptide de composition connue en amino-acides.

Aussi, dans le système phénol/eau (HCN) le R_F calculé de glycylalanine est de 0,49, tandis que celui du peptide glycylalanyl-glycylalanine est de 0,80 et celui du peptide glycylalanyl-glycylalanyl-glycylalanine est de 0,95

TABLEAU V
d'après PARDEE

R_F théorique et R_F observé de quelques peptides sur papier Whatman
n° I à 25° C

	Phénol/eau (HCN)		
	R_F expérimen- tal	R_F calculé	Erreur (%)
Glycyl-L-acide aspartique	0,09	0,09	0,00
Glycyl-L-tyrosylglycine	0,57	0,57	0,00
Glycyl-L-tryptophane	0,70	0,67	- 0,03
DL-leucylglycine	0,78	0,75	- 0,03
L-alanyldiglycyl-L-alanyl glycylglycine	0,94	0,90	- 0,04
DL-alanylglycine	0,58	0,49	- 0,09
L-leucyl-L-acide glutamique	0,48	0,65	+ 0,17

(II.) - Cette concordance entre le R_F théorique et le R_F observé est d'autant plus satisfaisante que l'on sait (BATE-SMITH et WESTALL [61]) que, même dans les conditions expérimentales les plus rigoureuses, la reproductibilité des valeurs de R_F ne dépasse pas une précision de $\pm 0,02$.

HEYNS et ALBERS [62] enfin, ont étudié le comportement des glycyl- et alanyl-polypeptides. Ils constatent que le R_F augmente graduellement avec le degré de polymérisation pour des solvants comme le phénol, alors qu'il diminue au contraire pour des solvants comme le butanol ou le système pyridine/alcool isomyl-lique.

TABLEAU VI
d'après HEYNS et ALBERS

	R_F Phénol	R_F (Pyridine/alcool amylique)
Glycylglycine	0,32 (I2.)	0,03 (I2.)
Triglycine	0,35	0,02
Tétraglycine	0,42	0,01
Pentaglycine	0,53	0,01
Hexaglycine	-	- (pas de révélation)
Nonaglycine	-	- (pas de révélation)
Alanylalanine	0,53	0,07
Trialanine	0,66	0,06
Tétraalanine	0,79	0,04

(I2.) - Les valeurs R_F sont identiques à celles du glycocolle.

Cette constatation de HEYNS et ALBERS peut presque être généralisée et être formulée ainsi : à mesure que la complexité d'un polypeptide augmente, le R_F dans le phénol tend vers l'unité, tandis que dans d'autres systèmes-solvants (butanol notamment) elle se rapproche de zéro : ce qui tend à produire sur les chromatogrammes bidimensionnels de polypeptides, une plage diffuse ninhydrine positive dans la partie inférieure droite du chromatogramme.

32) - Modalités d'application de la technique.

Les considérations théoriques et expérimentales que

nous venons de développer indiquent très nettement les possibilités de la méthode. Elle a été très appliquée à l'étude d'hydrolysats partiels de protéine.

a) Conditions d'hydrolyse. - Les di-, tri- et tétrapeptides étudiés proviennent d'hydrolysats partiels de protéines, obtenus soit par HCL N à 37°C pendant 3 à 4 jours (SANGER [63]), soit par un mélange à parties égales d'acide acétique glacial et d'acide chlorhydrique 10 N à 37°C pendant plusieurs jours (jusqu'à 58 jours) (CONSDEN [64]), soit par HCl 6 N (I3.) à 80°C pendant 15 heures en tube scellé sous vide (MONIER et FROMAGEOT [66]). A la fin de l'hydrolyse, l'excès d'acide chlorhydrique est chassé sous pression réduite par des évaporations multiples. La cinétique de l'hydrolyse partielle peut être suivie par des dosages d'azote aminé (VAN SLYKE : temps de réaction 30 minutes) et des groupements carboxyliques (VAN SLYKE, DILLON et Mac FADYEN). Il est parfois nécessaire de déminéraliser l'hydrolysate par dessalage au moyen d'un appareil à cathode de mercure mobile (I4.) (dispositif de CONSDEN [68] ou dispositif de ACHER, JUTISZ, FROMAGEOT [69]).

b) Préparation des hydrolysats partiels. - Bien que les hydrolysats partiels ainsi obtenus soient directement utilisables pour la chromatographie de partage sur papier, il est préférable, pour simplifier les problèmes à résoudre, de réaliser un fractionnement de base par groupes de peptides. Cette séparation se réalise par un ensemble de techniques, que nous aurons l'occasion de

(I3.) - Il est recommandé d'utiliser de l'acide chlorhydrique redistillé suivant la technique de MONIER et JUTISZ [65].

(I4.) - Au cours du dessalage, il peut se produire une destruction importante de l'arginine avec transformation en ornithine (STEIN et MOORE [67]). L'amélioration apportée par le dispositif d'ACHER, JUTISZ et FROMAGEOT pallie cet inconvénient.

décrire dans les pages suivantes et qui comprennent notamment le fractionnement ionophorétique, la chromatographie sur résines à échange d'ions, la chromatographie d'adsorption sur charbon, la chromatographie sur silice, etc...

Le "couplage" rationnel de ces techniques permet de simplifier suffisamment le mélange de peptides pour pouvoir pratiquer la chromatographie de partage sur papier avec efficacité.

c) Séparation chromatographique des peptides. - Le mélange initial étant simplifié, les différentes fractions sont séparées en chromatographie unidimensionnelle ou de préférence bidimensionnelle (15.). En chromatographie unidimensionnelle, il suffit de placer sur la ligne de départ un certain nombre de gouttes de la solution à étudier (10 à 20), tandis qu'une goutte nettement isolée est déposée à l'extrémité de la ligne et sert de guide, après révélation, pour le découpage des zones dans le reste du chromatogramme.

En chromatographie bidimensionnelle, on effectue parallèlement 4 à 8 chromatogrammes. Après séchage, l'un d'eux est développé de la façon habituelle et sert de guide. Les autres sont examinés en lumière ultra-violette ou révélés avec une solution diluée de ninhydrine (0,025 g p.100) qui permet de localiser sans les détruire les peptides dont la place approximative

(15.) - Certains auteurs (HANES et ISHARWOOD [70]) conseillent d'utiliser du papier lavé pour éliminer les traces d'acides aminés contenus dans le papier. La technique de lavage comprend les traitements suivants : $\text{CO}_2\text{Na}_2\text{H}$, eau distillée, acide acétique 2 N, eau distillée, solution aqueuse d'acétate de calcium à 0,1 g p.100 ml, eau distillée et éthanol aqueux à 50 p.100 (en volumes). Le lavage peut s'effectuer par paquets de 40 feuilles sur un filtre type BUCHNER, spécialement construit en matière plastique. L'opération demande environ 5 jours.

est déjà indiquée par le chromatogramme-guide et l'examen en lumière de WOOD. Suivant les données ainsi obtenues, les chromatogrammes uni- ou bidimensionnels sont découpés, les bandes ou les zones sont lavées à l'eau ou à l'éthanol aqueux (50 p.100 en volumes). L'élution peut être effectuée simplement, après découpage des bandes en petits morceaux, par extractions et centrifugations successives. Il est de beaucoup préférable d'utiliser les dispositifs simples de CONSDEN [71] (succion au moyen d'un tube capillaire), de DENT [72] (lavage chromatographique du papier), ou de SANGER [73], qui combine les deux méthodes précédentes.

d) Identification des peptides. - Les liquides de lavage obtenus, évaporés de préférence dans des récipients de polythène, sont soumis à une hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique 5,7 N pendant 24 heures à 100°C en tube capillaire scellé. Après évaporation et enlèvement de l'excès d'acide chlorhydrique sous pression réduite, les acides aminés constituant les petits peptides sont identifiés en chromatographie bidimensionnelle.

On détermine pour chaque peptide l'acide aminé porteur du groupement aminé libre, soit par désamination, soit par la technique des dinitrophényl-amino-acides de SANGER [74].

α) Désamination. - Les solutions de peptides sont évaporées dans des cupules creusées dans une baguette de polythène et le résidu est repris dans 30 à 100 μ l de HCl 6 N. La baguette est introduite à l'intérieur d'un tube à travers lequel passent des vapeurs nitreuses pendant une durée de 30 minutes (I6).

(I6.) - Il n'est pas nécessaire d'opérer à 30-35°C comme le conseille CONSDEN. SANGER [75] a obtenu des résultats tout à fait semblables à la température du laboratoire.

gouttes d'une solution de dinitrofluorobenzène (DNFB) à 4 g p. 100 ml d'alcool à 95° et on agite 2 heures. Après évaporation, l'excès de DNFB est éliminé par plusieurs traitements successifs par quelques gouttes d'éther sulfurique. Le DNP-peptide est ensuite hydrolysé par HCl 6 N pendant 5 heures à 110°C.

Les DNP-amino-acides libérés par hydrolyse sont repris par quelques μ l d'acétone à 50 p.100 (en volumes) et identifiés par une technique chromatographique sur papier (BLACKBURN [79] - MONIER et PENASSE [80] - BISERTE et OSTEUX [81]).

La méthode que nous avons mise au point en collaboration avec R. OSTEUX, est d'une application relativement aisée et rapide. Les figures 15, 16 et 17 nous montrent quelques exemples de fractionnement de mélanges de DNP amino-acides. Nous nous permettons d'insister sur le soin qu'il faut apporter au cours de la réalisation de cette technique si l'on veut éviter à coup sûr des erreurs importantes qui ont surtout pour origine la variabilité de comportement des systèmes-solvants (influence de la température, de la qualité du papier, de la saturation de l'atmosphère de la cuve à chromatographie, de la composition du mélange et de la quantité de DNP-amino-acides soumis à la chromatographie ...), la présence d'artefacts dans les hydrolysats (dinitrophénol), la difficulté de séparation de quelques groupes de DNP-amino-acides. Pour illustrer la méthode, nous présentons les résultats obtenus avec quelques peptides simples : (voir Tableau VII).

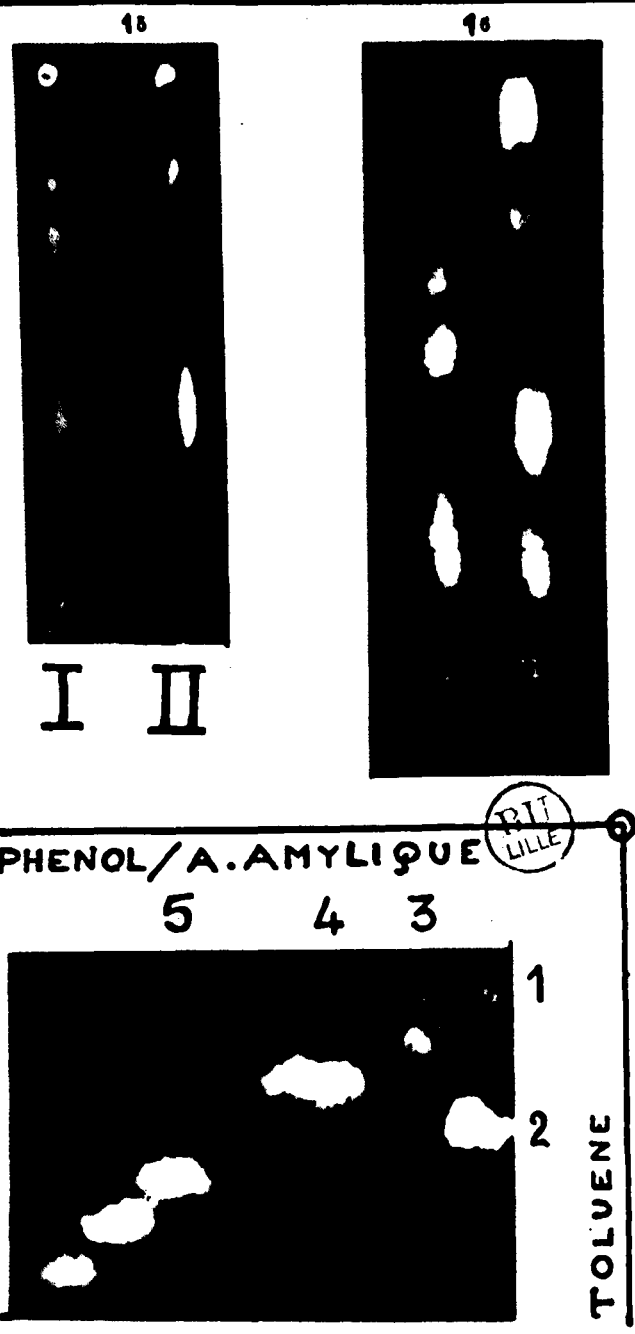


FIG. 15. — Groupes de DNP-aminoacides séparables par le système « toluène » (voir le texte page 53). De haut en bas : I : ac. aspartique, sérine, glycocolle, alanine, valine, leucine, lysine (di-DNP) ; II : ac. aspartique, sérine, alanine, valine + méthionine, leucine.

FIG. 16. — Chromatographie unidimensionnelle dans le système phénol-alcool isoamylique (nomenclature des zones de haut en bas). I : DNP-méthionine oxydée (deux taches), DNP valine ; II : acide DNP-aspartique, di-DNP-cystine, DNP-alanine, DNP-valine.

FIG. 17. — Chromatographie bidimensionnelle dans les solvants phénol-alcool amylique et « toluène » : la zone où sont groupées les taches a seule été photographiée ; les dimensions relatives du chromatogramme sont données par les deux traits noirs qui portent à leur intersection le spot de départ, et à partir desquels les R_f doivent être mesurés. 1 : DNP-sérine ; 2 : dinitrophénol ; 3 : DNP-glycocolle ; 4 : DNP-alanine + DNP-proline ; 5 : DNP-valine ; 6 : DNP-leucine ; 7 : di-DNP-lysine + di-DNP-tyrosine.

TABLEAU VII

~ 42 ~

R_F solvant I (I7.) . R_F solvant 2 (I7.)

DNP- glycy lleucine :	0,49	0,76
<u>Après hydrolyse</u>		
DNP- glyco colle :	0,26	0,34
Leucine (I8.) :	0,18	0,35
DNP- leucyl glycine :	0,45	0,71
<u>Après hydrolyse</u>		
DNP- leucine	0,60	0,79
Glyco colle (I8.)	0,51	0,02

Naturellement, dans le cas de peptides simples, il est possible également d'exécuter une chromatographie bidimensionnelle des acides aminés non substitués par le radical DNP avec les systèmes-solvants classiques.

Telle est la méthode générale d'étude qui permet de résoudre de nombreux problèmes relativement simples. Lorsque les taches des petits peptides sont situées en des emplacements qui ne correspondent pas à ceux qu'occupent normalement les amino-acides, la complication n'est pas trop grande. Il n'en est pas de même lorsqu'on a affaire à une tache se localisant en un endroit où se trouve habituellement un acide aminé. S'agit-il d'un amino-acide libre, d'un ou plusieurs peptides possédant le même comportement chromatographique ou d'un mélange de peptide et d'acide ? La technique que

(I7.) - Solvant I : toluène-pyridine-monochlorhydrique du glycol ammoniacal 0,8 N (5:1:3:3)
Solvant 2 : phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1). Dans le fond de la cuve, on place 200 à 300 cm³ d'une solution d'ammoniacal à 0,1 p.100 (en volumes) (BISERTE & OSTEUX).

(I8.) - Révélation par la ninhydrine.

nous avons décrite ne donne pas toujours des résultats nets et la question est parfois très délicate à résoudre.

Un autre problème difficile est celui des polymères d'un même amino-acide. Seules les données quantitatives très précises (dosages d'azote aminé avant et après hydrolyse, composition élémentaire, etc..) permettent d'obtenir une réponse. Un très beau travail d'analyse de ce genre a été réalisé par DEKKER, STONE et FRUTON [82], qui ont isolé des extraits aqueux d'une algue marine la L-pyrrolidonoyl- α -L-glutaminyl-L-glutamine.

42) - Application et résultats de la méthode. - Parmi les nombreuses applications de la méthode, nous avons choisi quelques exemples particulièrement démonstratifs.

a) Structure de la gramicidine S. - Des travaux antérieurs avaient démontré que la gramicidine S contenait 5 amino-acides dans les proportions équimoléculaires (valine, ornithine, leucine, phénylalanine et proline) (SYNGE [83]), et possédait la structure d'un cyclopeptide ; on n'avait pu déceler de groupement carboxyle libre et SANGER [84] avait établi que le seul groupement aminé libre était le δ -NH₂ de l'ornithine. En réalisant l'hydrolyse partielle de la gramicidine S dans HCl 10 N à 37°C, pendant 58 jours, CONSDEN, GORDON, MARTIN et SYNGE [85] sont parvenus à isoler et identifier les dipeptides suivants : valyl-ornithine, ornithyl-leucine, leucyl-phénylalanine, phénylalanyl-proline, et deux tripeptides : phénylalanyl-prolyl-valine et valyl-ornithyl-leucine. Toutes ces données ont été vérifiées avec des dipeptides de synthèse et ont permis d'établir dans la gramicidine S la séquence peptidique suivante :

- valyl-ornithyl-leucyl-phénylalanyl-prolyl.

b) Parmi les autres problèmes abordés par cette technique, il faut également citer l'étude des hydrolysats partiels

de protéines. Malgré la très grande complexité (I9.) du problème et en dépit des disproportions entre la somme de travail à fournir et le bilan des acquisitions possibles, de nombreux chercheurs se sont attachés à cette question.

CONSDEN, GORDON [87] , MARTIN [88] , en étudiant les hydrolysats partiels de laine, ont pu identifier de nombreux dipeptides d'acides dicarboxyliques et de cystine. La conclusion la plus intéressante de leurs travaux réside dans le fait que des acides aminés comme l'acide glutamique, l'acide aspartique et la cystine sont engagés soit par leur carboxyle, soit par leur groupement aminé dans des liaisons peptidiques avec la plupart des autres amino-acides. Il existe également un pourcentage élevé de radicaux d'acide glutamique liés entre eux. Ces faits présentent naturellement un intérêt fondamental et démontrent que l'hypothèse de BERGMANN sur la périodicité des acides aminés dans les chaînes polypeptidiques n'est pas universellement valable.

Enfin, SANGER et TUPPY [89] , étudiant la fraction polypeptidique basique de l'insuline oxydée, ont pu, en rassemblant les résultats de l'identification de 50 di-, tri-, tétra- et pentapeptides, déterminer un certain nombre de séquences de cette chaîne (voir page 53).

Ces quelques exemples d'application indiquent suffisamment les possibilités de la méthode. Elle est très séduisante, quoique la réalisation en soit laborieuse, fastidieuse même, lorsqu'on s'adresse à des mélanges complexes provenant de l'hydrolyse partielle des protéines. Le nombre de petits peptides obtenus au cours de l'hydrolyse partielle est très grand.

(I9.) - S'il y a dans la protéine 17-18 amino-acides différents, il peut se former 289 à 324 dipeptides différents (DESNUELLE [86]).

D'autre part, un certain nombre de liaisons peptidiques sont très labiles et il est impossible de déterminer les enchaînements des amino-acides qui les entourent. Lorsqu'on accumule patiemment et obstinément les données expérimentales, les résultats deviennent de plus en plus intéressants.

Il semblait devoir être également fructueux d'aborder par un ensemble de techniques analogues à celles que nous venons de décrire, la question de la structure des polypeptides de poids moléculaires plus élevé (ceux par exemple qui résultent de certaines hydrolyses enzymatiques des protéines). Malheureusement, ainsi que nous allons le voir maintenant, la séparation des "gros polypeptides" s'avère encore plus difficile que celle des oligopeptides.

B - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE DES POLYPEPTIDES DE POIDS MOLECULAIRE ELEVE.-

I^o) - Chromatographie de partage sur papier.-

Pour la séparation de peptides de poids moléculaire assez élevé, il est recommandé d'utiliser du papier Whatman n° 4. Le Whatman n° 3, plus épais, est avantageux pour exécuter des chromatographies séparatives. Le papier Munktell n° 20/150, recommandé par CREMER et TISELIUS [90] pour l'électrophorèse sur papier, permet aussi de fractionner de plus grandes quantités de peptides, mais malheureusement la rapidité de progression du front (6 à 8 heures) nuit à la résolution chromatographique.

Incontestablement, le meilleur système solvant est le butanol/acide acétique (voir plus haut). La chromatographie bidimensionnelle peut être réalisée en utilisant ce même système-solvant dans les deux dimensions (PHILLIPS [91], BISERTE et

BOULANGER [92]) (voir figure 18). On obtient alors une répartition du complexe peptidique sur une diagonale partant du point de départ de la chromatographie. SANGER et TUPPY [92bis] réalisent généralement leurs chromatographies bidimensionnelles avec le m-crésol (NH_3 0,03 %) comme premier système-solvant et le butanol/acide acétique (20.) comme second. Il faut signaler que, dans de nombreux cas, alors qu'il n'existe aucune séparation nette en chromatographie unidimensionnelle avec les systèmes-solvants utilisés, il est possible néanmoins d'obtenir une résolution satisfaisante en chromatographie bidimensionnelle avec les mêmes systèmes-solvants : le premier solvant enlève probablement un certain nombre d'impuretés chromatographiquement gênantes.

La révélation se fait par l'examen en lumière de WOOD, par la réaction à la ninhydrine avec interprétation immédiate ou tardive (24 ou 48 heures après développement), par la réaction de PAULY, PORATH et FLODIN [93] ont décrit une méthode de révélation assez ingénieuse qui repose sur le principe suivant. Les acides aminés, les peptides et les protéines, par effet-tampon, empêchent l'hydrolyse de la cellulose du papier provoquée par des agents comme l'acide sulfurique 0,004 N à 110°-120°C. Ensuite, par une réaction à l'orcinol, il est possible de localiser en blanc sur fond rouge violet les taches correspondant aux acides aminés et aux peptides. Nous avons essayé cette technique mais en chromatographie bidimensionnelle l'interprétation est toujours assez délicate. Enfin, RYDON et SMITH [94] ont proposé récemment une méthode de révélation très sensible pour les peptides. Elle consiste à former le N-chloro-peptide par chloruration. Ensuite, par pulvérisation sur le chromatogramme

(20.) - Il y a souvent intérêt à laisser passer le front du butanol au delà du bord inférieur du papier.

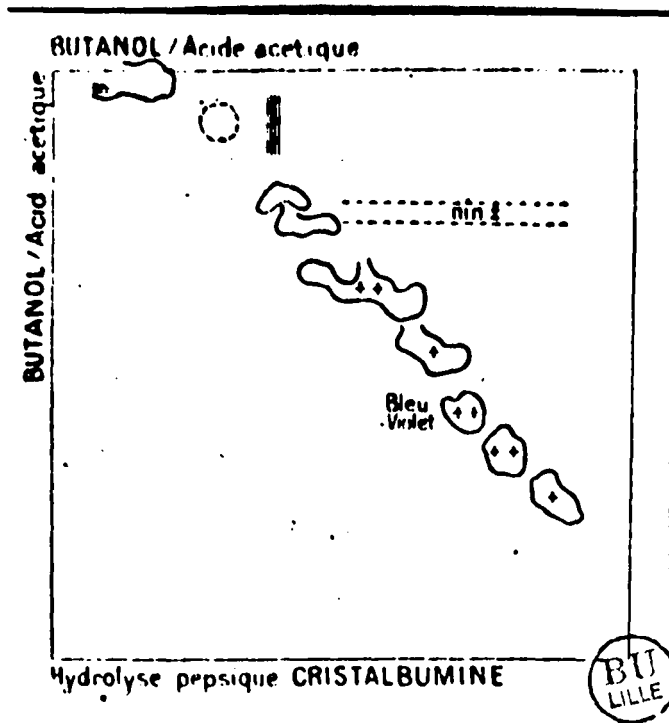


FIG 18

Chromatographie bidimensionnelle
avec le même système - solvant.

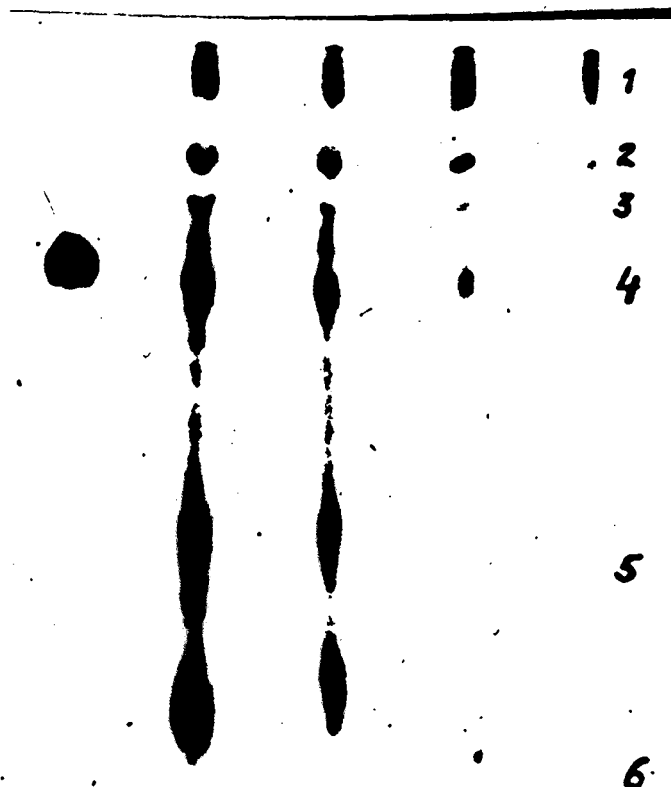
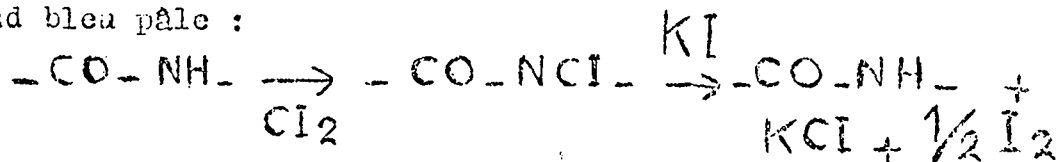


FIG 19

Révélation de peptides à "doses progressives"
de g. à d. : ($\frac{1}{2}$, 1, 1.5, 2 mg) (d'après LI et TISELIUS)

d'un réactif contenant de l'amidon et de l'iodure de potassium, les peptides apparaissent sous forme de spots bleu-foncé sur fond bleu pâle :



La quantité de peptides à utiliser est de l'ordre du milligramme (2I.). En chromatographie unidimensionnelle, il est très utile d'opérer avec des concentrations croissantes de peptides (par exemple de 0,05 à 2 mg), de façon à obtenir une échelle de gradation dans la coloration à la ninhydrine. Ceci facilite considérablement le repérage des différentes taches.

En chromatographie unidimensionnelle, il est fréquent d'obtenir des effets de traînée (les peptides les plus gros restent généralement au spot de départ et la résolution ne portant que sur quelques taches bien isolées et rapides dans le système butanol/acide acétique). En chromatographie bidimensionnelle, on observe généralement des spots larges, à contours assez mal définis. Assez souvent ceux-ci se rassemblent sous forme d'une plage diffuse au niveau de la partie inférieure droite du chromatogramme.

(2I.) - Cette quantité est très largement supérieure à celle utilisée en chromatographie d'acides aminés et de petits peptides. C'est le manque de sensibilité de la réaction à la ninhydrine qui oblige à forcer la dose. Il en résulte certainement des conditions très défavorables à la séparation chromatographique. Nous avons essayé sans succès de révéler les chromatogrammes de peptides par contact avec des bandes de papier tamponné à pH 7,4 et inhibées d'une suspension de carboxypeptidase dans l'espoir de détacher du peptide un acide aminé terminal et de le révéler facilement avec la ninhydrine. La technique de RYDON & SMITH que nous n'avons pas encore utilisée, nous permettra certainement de réaliser les chromatographies avec des quantités de peptides beaucoup plus faibles.

La chromatographie unidimensionnelle se prête non seulement à l'analyse d'un mélange peptidique, mais peut être utilisée également comme méthode séparative. Mais, dans ce dernier cas, la récupération des zones doit se faire avec beaucoup de précautions. Un exemple démonstratif de ce manque de sélectivité nous est fourni par l'étude du fractionnement d'hydrolysats pepsiques de protéines (BISERTE et BOULANGER [95]). Un mélange de peptides obtenus après fractionnement de base sur résines à échange d'ions est chromatographié dans le système butanol/acide acétique. Il est possible d'identifier 13 zones différentes dont les R_F sont les suivants :

A_I	A_2	C	D	EK	B_I	B_2	G
0,04	0,10	0,12	0,13	0,21	0,25	0,30	0,35
		F	P_I	P_2	P_3	P_4	
		0,45	0,55	0,61	0,68	0,84	

Chacune de ces zones, après élution, est soumise de nouveau à une chromatographie de partage dans le même système-solvant. Il est alors possible de constater leur hétérogénéité. A côté d'un composant principal, il existe 3 à 4 composants mineurs : par exemple, la zone F se résout en 3 composants mineurs F_2 (R_F : 0,20), F_4 (R_F : 0,15), F_3 (R_F : 0,23) et un composant principal F_5 (R_F : 0,46-0,50). Après élution de tous les composants principaux, un contrôle d'homogénéité est de nouveau effectué, toujours dans le même système-solvant, et malgré cette double séparation, certaines fractions sont encore hétérogènes (notamment I_{26} , P_{37} et P_{46}) (Figure 20). Enfin, certaines fractions, "chromatographiquement pures" dans le système butanol/acide acétique (exemple : G_4) se révèlent hétérogènes dans un système-solvant comme le phénol (NH_3), qui est

pourtant extrêmement peu sélectif.

En chromatographie bidimensionnelle, la sélectivité dans la résolution est plus assurée. Mais de toute façon, un autre problème très important se pose encore au cours de la chromatographie séparative : celui du contrôle de la pureté des fractions récupérées.

Lorsqu'une zone bien définie a été éluee après chromatographie séparative, il s'agit de savoir si l'on se trouve en présence d'un seul polypeptide ou d'un mélange de peptides de comportements chromatographiques identiques. Le critère de pureté que nous proposons comporte :

1°) - contrôle d'homogénéité dans plusieurs systèmes-solvants.
2°) - vérification de la constance de la composition en amino-acides après hydrolyse totale de différentes parties de la tache et de la même tache récupérée à partir de différents chromatogrammes (SANGER et TUPPY [96]).

3°) - étude du NH_2 terminal par la méthode des dinitrophényl-amino-acides (SANGER et TUPPY [97]) ; toutefois, il est possible, à cause de l'influence du groupement aminé libre sur le comportement chromatographique d'un peptide (voir page 32) de trouver ensemble deux peptides différents possédant le même amino-acide en position terminale ;

4°) - étude du groupement carboxylique terminal par la méthode de THOMPSON [98] (22.). Le principe de cette technique consiste à faire agir à pH 7,4 sur le peptide de la carboxypeptidase cristallisée. Les acides aminés libérés sont adsorbés sur une

(22.) - Il existe d'autres méthodes de détermination du groupement carboxylique terminal, notamment celle de FROMAGEOT, JUTISZ, MEYER et PENASSE [98 bis] qui est très satisfaisante. Pour la détermination des critères de pureté d'un peptide, la méthode de THOMPSON est très commode.

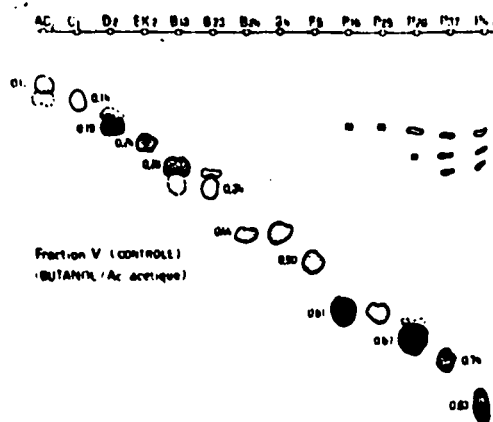


FIG. 4. -- Après la première séparation par le système butanol/ac. acétique, il est possible d'identifier 13 zones : A₁, A₂, C, D, EK, B₁, B₂, G, F, P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, P₇, P₈, P₉, P₁₀, P₁₁, P₁₂, P₁₃. Après élution, ces diverses fractions sont, de nouveau, chromatographiées dans le même système-solvant. Chaque zone se décompose alors en plusieurs spots (exemple : F₁, F₂, F₃, F₄, F₅). Seul le composant principal est récupéré (exemple : F₁). Finalement, ces groupes de composés sont séparés en chromatographie unidimensionnelle par le système phénol (ammoniac). On peut encore obtenir différents sous-groupes (par exemple G₁, G₂).

FIG 20

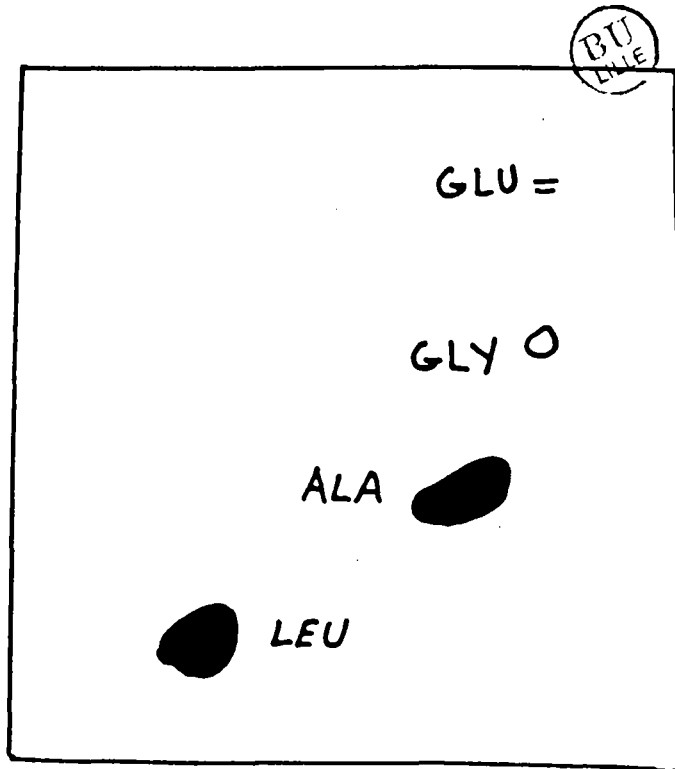


FIG 21.
Contrôle de pureté à la carboxypeptidase
(existence de deux peptides, l'un terminé
par la leucine, l'autre par l'alanine, voir
Tableau XIV).

résine par de l'ammoniaque 2 N et identifiés en chromatographie uni ou bidimensionnelle (Figure 2I). Pour des temps d'action de l'enzyme assez courts (4 à 6 heures), seul l'acide aminé terminal porteur d'un groupement carboxylique libre est libéré.

5°) - enfin, on pourra mettre à profit la formule de détermination du R_F théorique de PARDEE [99] (voir plus haut).

En conclusion, la chromatographie de partage sur papier des peptides de haut poids moléculaire est réalisable, mais nécessite dans ses modalités d'application et d'interprétation un certain nombre de précautions rigoureuses et indispensables.

2°) - Modalités d'application de la méthode.-

Comme dans le cas des "petits peptides", la complexité des mélanges peptidiques à étudier nécessite la mise en oeuvre d'un fractionnement préalable, mais dont la réalisation est plus délicate encore. Cette simplification est longue et difficile. La chromatographie sur papier est, déjà elle-même, une méthode séparative que l'on peut coupler avec la chromatographie de partage sur colonne, soit sur poudre de cellulose, soit sur kieselguhr (ou Hyflo-Super-Cel) (voir page 55). Parmi les autres méthodes, citons la chromatographie sur résines à échange d'ions (voir page 60), le fractionnement ionophorétique et l'électrophorèse uni- ou bidimensionnelle (voir page 77), la distribution à contre-courant et surtout les méthodes d'analyse par développement par déplacement et d'analyse par déplacement par transporteur (TISELIUS) (voir page 78). En couplant rationnellement toutes ces techniques, on peut espérer arriver à une simplification notable du mélange peptidique.

Chacune des fractions ainsi obtenues, analysée par

chromatographie de partage sur papier, se révèle constituée par un nombre limité de peptides. C'est à ce stade qu'il faut s'assurer de l'homogénéité des fractions, en utilisant les critères de pureté que nous avons décrits plus haut. Mais, en supposant que les peptides ainsi séparés/soient purs, la détermination de la séquence des amino-acides est encore très délicate et nécessite une nouvelle simplification portant cette fois sur la structure des polypeptides. On peut y parvenir soit par hydrolyse partielle ménagée (HCl 10 N à 37°C pendant 3 jours, HCl 6 N à 37°C pendant 6 heures, HCl N 30 minutes à 100°C), soit par hydrolyse enzymatique à l'aide de la chymotrypsine et de la trypsine.

Les "sous-fractions" ainsi obtenues peuvent alors être analysées suivant les méthodes générales que nous avons exposées au cours de l'étude des "petits peptides" (voir page 38). L'identification de ces peptides s'effectue essentiellement par l'hydrolyse acide totale suivie de chromatographie bidimensionnelle, par détermination des groupements NH_2 et $COOH$ terminaux, et enfin par l'application des méthodes d'étude de la séquence des amino-acides (EDMAN [100], LEONIS et LEVY [101], FRAENKEL-CONRAI [102], INGRAM [103]).

3°) - Applications de la méthode.-

Les difficultés techniques nombreuses expliquent la lenteur des acquisitions. Toutefois, celles-ci sont déjà très importantes : c'est ainsi que SANGER et TUPPY [104], SANGER et THOMPSON [104 bis], ont réussi à déterminer de façon précise la structure de l'insuline oxydée. En utilisant conjointement les résultats d'analyse fournis par les hydrolysats peptique, chymotrypsique et tryptique, ainsi que les données antérieurement établies par l'hydrolyse partielle acide de cette chaîne, ces auteurs ont pu déterminer complètement la séquence de 30 ré-

sides d'acides aminés de la fraction B et de 21 résidus d'acides aminés de la fraction A

Il n'est pas nécessaire d'insister sur l'intérêt considérable que présente, tant du point de vue théorique que pratique, la connaissance de la structure de l'insuline ; les observations de SANGER et TUPPY ont permis en outre de confirmer les travaux de BERGMANN sur la spécificité d'action des endopeptidases. Ces travaux suffiraient déjà à démontrer la validité de la méthode générale que nous avons résumée. Cependant, tout en reconnaissant que le travail fourni par SANGER et TUPPY est d'une importance capitale, il faut remarquer que ces auteurs se sont attaqués à un problème relativement simple, qu'ils ont eu le mérite de mener à bien avec un ensemble de techniques relativement faciles à mettre en oeuvre. Les travaux de LI et de TISELIUS [105] sur un substrat déjà beaucoup moins simple (l'hydrolysât peptique de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), de poids moléculaire de 20.000 environ) montrent que les difficultés du problème augmentent considérablement en fonction du poids moléculaire du substrat auquel on s'adresse.

Les résultats positifs très modestes que nous avons obtenus avec un substrat encore plus complexe (la sérum-albumine de poids moléculaire de 65.000 environ) et qui sont rassemblés dans le chapitre D, confirment cette opinion.

C) - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR COLONNE -

Il nous semble intéressant de compléter cet exposé par quelques indications sur la chromatographie de partage des peptides sur colonnes.

Des résultats ont été obtenus avec deux substances inertes : la poudre de cellulose d'une part et l'"Hyflo-Super

Cel" (ou Kieselguhr) d'autre part. Les autres adsorbants, notamment l'amidon, qui est très utilisé pour la séparation des amino-acides, ne conviennent pas au fractionnement des peptides de poids moléculaire élevé (LI et PEDERSEN [106] - FELS et TISELIUS [107]). On peut aboutir à des erreurs graves, comme par exemple le cas du "peptide A" que BOORSOOK et coll. [108] avaient isolé de nombreux tissus et de la peptone de WITTE par fractionnement sur colonne d'amidon. En réalité, FELS et TISELIUS ont démontré qu'il s'agissait d'un mélange de peptides qui apparaissent très rapidement au bas de la colonne d'amidon parce qu'ils ne sont pas adsorbés.

a) - Colonne de Kieselguhr (23.).-

L'Hyflo-Super-Cel (Kieselguhr) est un très bon support pour la phase stationnaire, car il est très peu adsorbant. Il permet de réaliser des chromatographies de partage "pures" et peut être utilisé pour les molécules de grosse taille. La préparation de ce modèle de colonne est réalisé suivant les modalités particulières précisées par MARTIN [109] :

Dans un vase à précipiter on mélange très soigneusement l'Hyflo-Super-Cel avec la moitié de son poids de la phase stationnaire du système-solvant utilisé ; puis on ajoute par petites portions la phase mobile jusqu'à consistance crémeuse. Le mélange est alors versé doucement dans la colonne à chromatographie, constituée par un tube de verre muni à son extrémité inférieure d'un disque de verre fritté de porosité 2 ou 3. L'ensemble est homogénéisé par tassement avec un disque perforé monté sur une baguette ; on recueille des fractions de 0,5 à 2 ml, à l'aide d'un collecteur automatique.

(23.)- Hyflo-Super-Cel : Johns MANVILLE et Co (NEW-YORK)

BELL et col, [II0] ont utilisé avec succès des colonnes Hyflo-Super-Cel pour séparer les divers types de Polymyxines, antibiotiques isolés du milieu de culture de différentes souches de B. polyxyma. MARTIN et PORTER [III] purifient la ribonucléase par chromatographie de partage sur kieselguhr.

b) - Colonne de poudre de cellulose.-

L'emploi de ce type de colonne a été pour la première fois préconisé par CONSDEN, GORDON et MARTIN [II2]. Il est recommandé d'utiliser la poudre de cellulose connue commercialement sous le nom de Solka Floc BW 200 (24.). Celle-ci est soigneusement traitée et lavée suivant les données de CAMPBELL, WORK et MELLANBY [II3] (eau distillée, acide acétique à 5 p.100 à 100°C, eau distillée, alcool absolu à chaud, éther sulfurique). Finalement, après séchage à 110°C, elle est mise en suspension et conservée dans l'acétone. Cette suspension acétonique est versée dans une colonne constituée par un tube de verre muni à son extrémité inférieure d'un disque en verre fritté de porosité 2 ou 3. Après tassage correct (voir colonne de kieselguhr), le système-solvant (25.) utilisé est passé jusqu'à saturation complète de la colonne. On se rend compte facilement de la satu-

(24.) - Solka-Floc BW 200 (BROWN COMPANY, 146, Avenue des Champs-Elysées, PARIS 8ème)

(25.) - On utilise généralement le mélange solvant butanol/acide acétique. On peut également employer le système alcool n propylique/alcool n-butylique/HCl 0,1 N (2:1:1) ou le phénol saturé d'eau. Dans le cas de ce dernier solvant, au cours de la saturation, la poudre de cellulose prend une teinte brunâtre. Il est recommandé dans ce cas particulier d'effectuer toutes les opérations à l'obscurité. L'évaporation sur verre de montre des fractions recueillies s'effectue à une température de 37°C.

ration en prélevant une petite quantité du liquide effluent et en y ajoutant une goutte d'eau : lorsque l'addition de cette goutte d'eau produit un trouble dû à la formation d'un système diphasique, la colonne est prête. Il suffit alors de passer sur la colonne très lentement le mélange de peptides dissous dans la phase organique du même système-solvant, puis la phase organique elle-même. Des fractions de volume connu sont recueillies grâce à un collecteur automatique. Après évaporation sur verre de montre à température du laboratoire, chacune des fractions ainsi obtenues est étudiée en chromatographie sur papier unidimensionnelle, de préférence dans le même système-solvant.

c) Modalités d'application de la technique de chromatographie sur colonne :

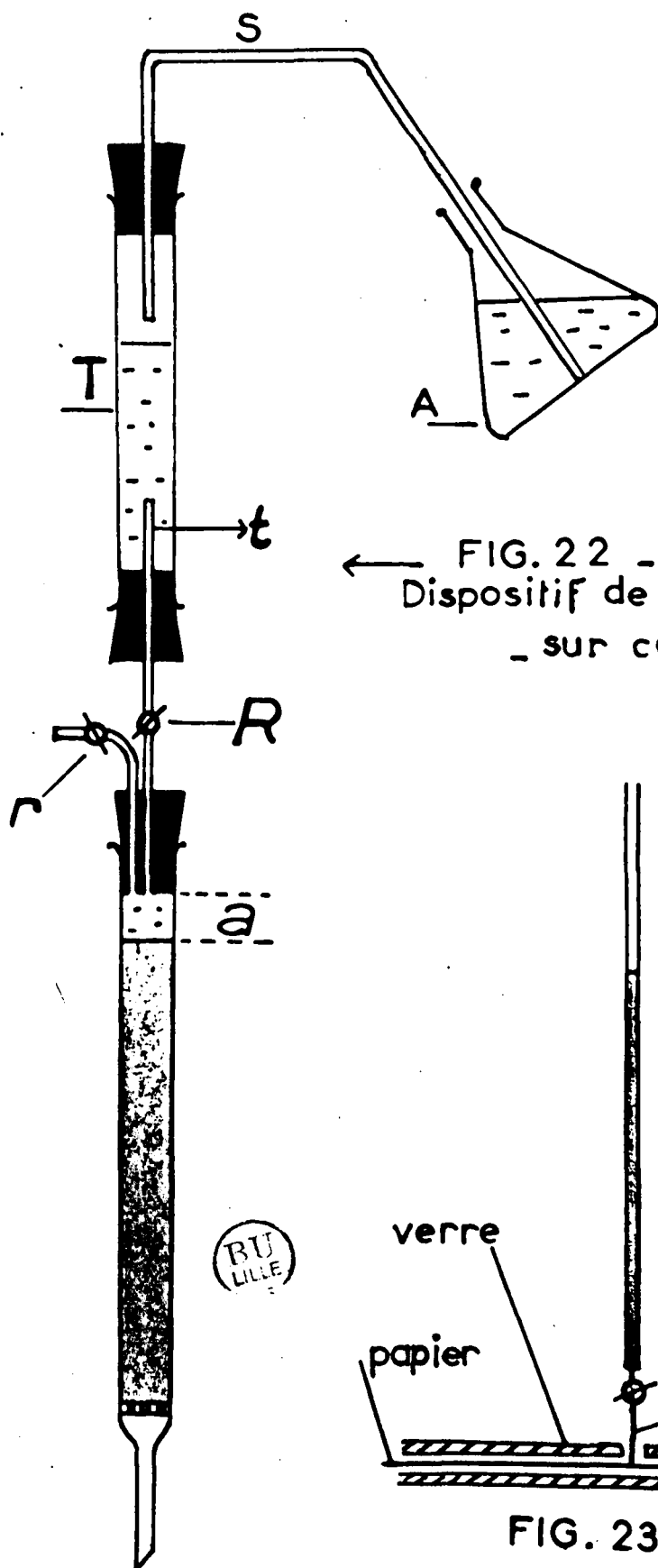
L'application de cette technique est très délicate et nécessite des précautions très rigoureuses (LESTER-SMITH [114]). La question de saturation du solvant en eau est ici très importante : un solvant sous-saturé "prend" de l'eau fixée au support inerte ; inversement un solvant sursaturé en "cède". Il est préférable, notamment pour le système butanol/acide acétique, de préparer le système solvant plusieurs jours à l'avance. D'autre part, il faut éviter, au maximum, les changements de température dans le laboratoire pour éviter les démixtions des systèmes-solvants. Pour éviter ces inconvénients, on peut d'ailleurs munir les colonnes de chromatographie d'une gaine d'amiante. Ces démixtions du solvant expliquent les effets de "double zone" observés quand on chromatographie un composé pur sur des colonnes de Kieselguhr. La vitesse d'écoulement du solvant doit être étudiée et réglée minutieusement ; au cours de ces séparations, qui se prolongent généralement 4 à 8 jours, une vitesse trop grande ne permet pas l'équilibre entre

la phase mobile et la phase stationnaire : il en résulte généralement une augmentation de la valeur de R_F et des phénomènes de queue. Il ne faut pas non plus trop ralentir la vitesse d'écoulement (ni arrêter la colonne) : ceci produit, en effet, un élargissement des zones par phénomène de diffusion. Il faut cependant toujours se rappeler que la réussite d'une chromatographie nécessite souvent une exceptionnelle patience. Le dispositif de colonne que nous utilisons habituellement et qui nous donne entière satisfaction est schématisé sur la figure 22. Dans les expériences que nous avons réalisées, la phase mobile passe toujours sans pression additionnelle à la vitesse d'une goutte par 45 secondes. La régularité de l'écoulement est assurée à l'aide du robinet (R). Le remplissage complet du segment de colonne (26.) est assuré à l'aide de l'ouverture du robinet (r). S'il se produit des démixtions du système-solvant au cours de l'opération, le segment de tube capillaire (t) permet la rétention de la phase aqueuse démixée dans la partie inférieure du tube (T). L'inclinaison du récipient (A) permet également d'éviter l'alimentation du siphon (S) par la phase aqueuse qui peut se séparer au cours de l'opération.

d) - Chromatographie "couplée" (colonne de cellulose ou de kieselguhr + papier-filtre).-

On peut utiliser également une micro-colonne munie à son extrémité inférieure d'un capillaire effilé dont la pointe repose sur une feuille de papier-filtre placée entre deux plaques de verre (la plaque supérieure étant percée d'un trou

(26.) - Il y a intérêt à réduire au maximum ce segment de colonne pour éviter les démixtions du solvant dans cette région. Car la phase aqueuse libérée, en venant se déposer sur le sommet de la colonne, perturbe considérablement la chromatographie.



← FIG. 22 -
Dispositif de chromatographie
sur colonne

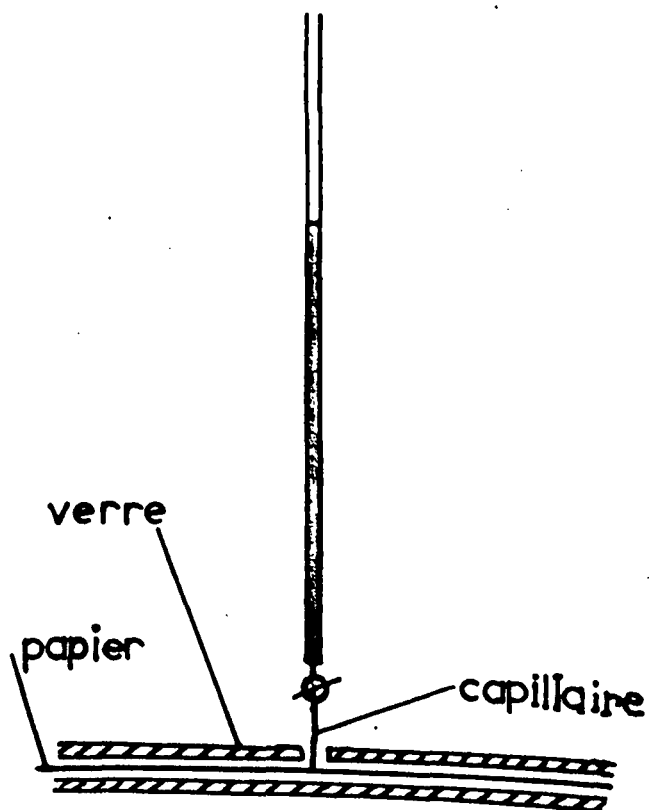


FIG. 23
chromatographie "couplée"
papier - colonne

de quelques millimètres de diamètre (27.). Le liquide qui s'écoule imbibe le papier circulairement ; lorsque le diamètre du cercle atteint 30 à 40 cm, le papier est remplacé. Après révélation de la feuille entière ou de secteurs découpés dans la feuille, on observe un certain nombre d'anneaux concentriques très réguliers (Figure 23). Ce dispositif réalise en somme deux chromatographies de partage successives : l'une sur la colonne d'Hyflo-Super-Cel, l'autre sur la feuille de papier-filtre, qui joue le rôle de "correcteur de séparation".

II) - LA CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES A ECHANGE D'IONS :

Nous avons également songé à appliquer au fractionnement des polypeptides les propriétés des résines à échange d'anions et de cations. Ce sont surtout les travaux de PARTRIDGE et coll. [II7] qui nous ont guidé au cours de ces recherches. En effet, ces auteurs ont étudié minutieusement les modalités d'application aux amino-acides de la chromatographie par déplacement sur des colonnes de résines à échange d'ions.

a) Types d'échangeurs d'ions : (Voir Tableau VIII)

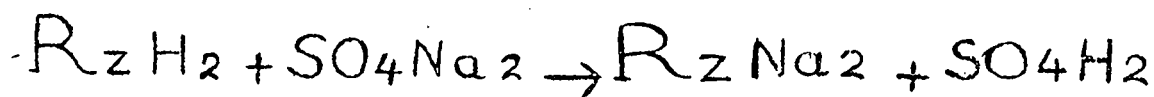
Ces résines sont généralement fabriquées par polymérisation : condensation de polyphénols avec le formol (échangeurs

(27.) - Ce dispositif a été utilisé par TISELIUS et HAGDAHL [II5] avec des colonnes de charbon. DRAKE [II6] emploie également un tambour cylindrique tournant garni d'une feuille de papier-filtre, dont le mouvement commande le déplacement de la colonne parallèlement à son axe. Les gouttes recueillies à la sortie de la colonne forment une spirale le long du papier.

d'anions) ou substances du type polystyrène, copolymérisé avec des quantités variables de divinylbenzène (échangeurs de cations).

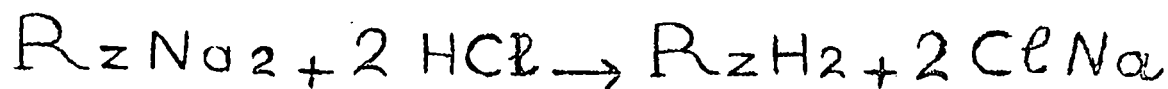
) - Echangeurs de cations : Elles contiennent des groupements acides, soit SO_3H , CO_2H , ou hydroxylephénolique.

Résines unifonctionnelles fortement acides : Elles contiennent un seul type de groupement ionisable : SO_3H (Amberlite I R 120, DOWEX 50, PERMUTITE 50). Elles échangent leur hydrogène à tous les pH suivant le schéma général



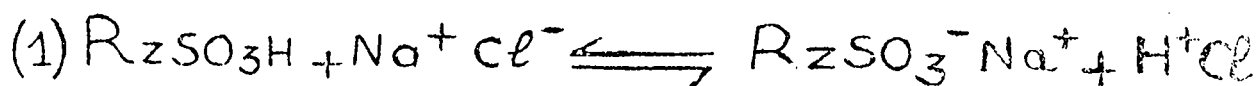
(R_z représentant la matrice de la résine)

Après cet échange, il est possible de régénérer la résine par action d'un acide :

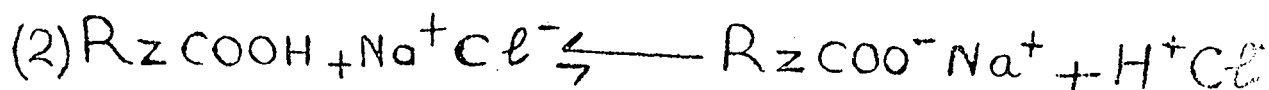


Résines unifonctionnelles faiblement acides. - Elles contiennent un seul type de groupement faiblement ionisé : CO_2H (Amberlite IRC 50). Elles échangent difficilement leurs ions hydrogènes et ne le font qu'en milieu de pH compris entre 6 et 14. La différence fondamentale entre ces deux types d'échangeurs de cations est illustrée par les équations suivantes :

- Résine fortement acide :



- Résine faiblement acide :



(le sens du déplacement des équations est représenté approximativement par la longueur des flèches). Dans le cas de résine

TABLÉAU VIII

TYPE D'ÉCHANGEURS D'IONS

Type d'échangeurs	Cation	Cation	Anion	Anion
Groupe actif	SO ₃ H	CO ₂ H	Aminé modifié	Aminé modifié
Comportement chimique	Acide fort	Acide faible	Base faible	Base faible
Marques commerciales	Dowex 5 (+) Amberlite IR 120 (+) Fermutite 50 (++) Malcite ECR Duolite C ₁ et C ₃	Amberlite IRC 50 Duolite CS 100	Amberlite IR 4B Déacidite 200 	Dowex 2 Amberlite IRA 400 Amberlite IRA 410 Deacidite 300

(+) - DOW CHEMICAL CO, MIDLAND (Michigan) USA.

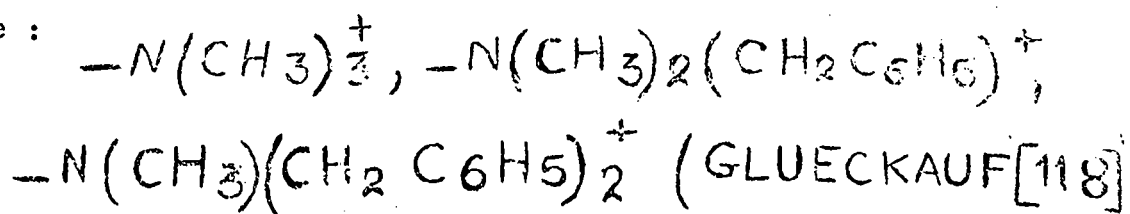
(++) - ROHM & HAAS company, Washington Square, PHILADELPHIE, 5 P.A.

(+++)- PHILLIPS & PAID, 31, rue de la Vanne, MONTROUGE (Seine)

faiblement acide, la réaction avec un sel d'acide fort est difficile parce que les ions H^+ libres produits déplacent l'équilibre vers la gauche. Elle se comporte donc comme un acide faible insoluble, peut servir de tampon et permet de conduire les adsorptions sous pH contrôlé.

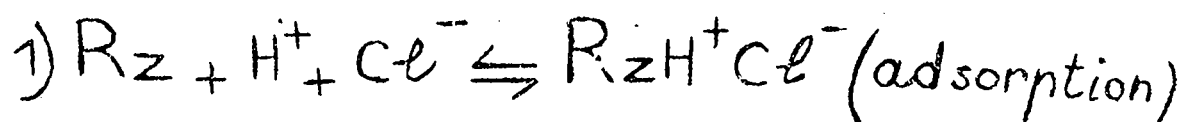
Résines polyfonctionnelles : (Amberlite IR 100 et IR 105, Zeo carb 215, Dowex 30, Wofatite P, K, KS). Elles contiennent des groupements sulfonés et des hydroxyles phénoliques. Les groupements OH ne cèdent leur hydrogène qu'en solution très alcaline. L'utilisation de ce type de résine est assez restreinte dans le domaine biologique.

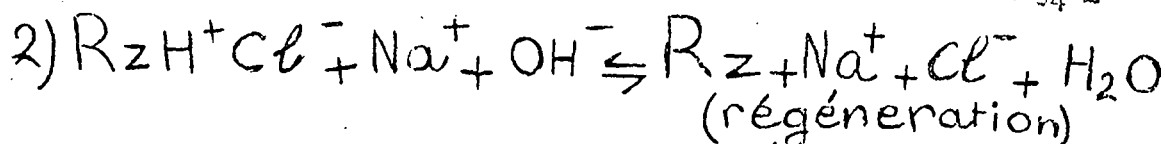
3) Echangeurs d'anions : De même que les résines à groupements acides se comportent comme des échangeurs de cations, celles qui portent des groupements aminés modifiés ($-NH_2, =NH, \equiv N$) deviennent des adsorbants ou échangeurs d'anions. Certains échangeurs d'anions sont faiblement basiques et n'adsorbent les anions qu'en solution acide (pH 1 à 7). D'autres types, plus fortement basiques par suite de l'introduction de groupements substitués du type :



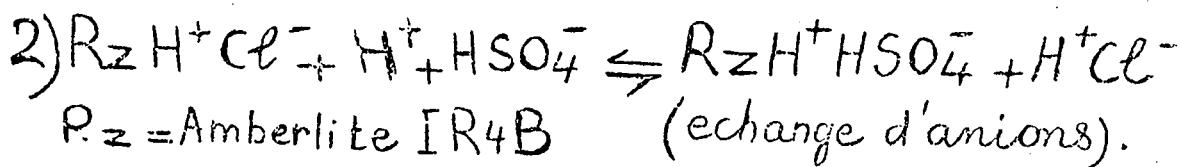
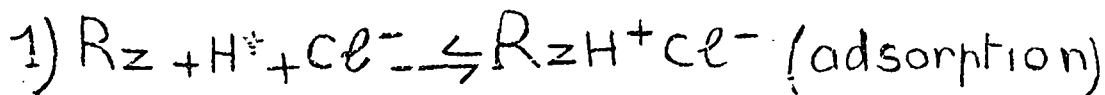
fonctionnent dans une zone de pH comprise entre 1 et 10.

Résines faiblement basiques (Deacidite 200, Amberlite IR4B). - L'enlèvement des acides par ce type de résine peut être illustré comme suit :





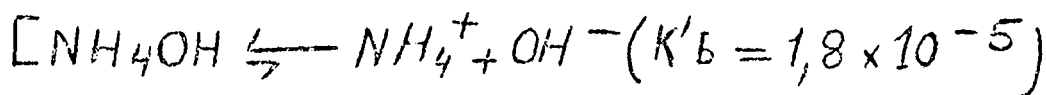
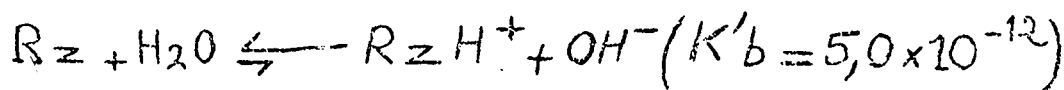
Dans le cas d'un mélange d'acides (HCl et SO_4H_2 par exemple), l'acide sulfurique est adsorbé préférentiellement. Le mécanisme de l'opération peut être illustré de la façon suivante :



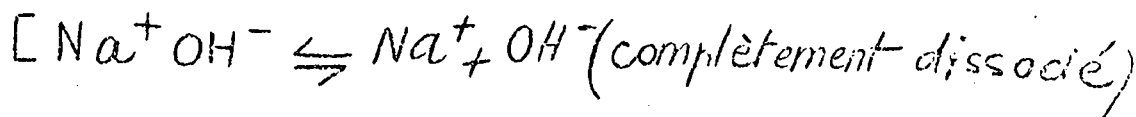
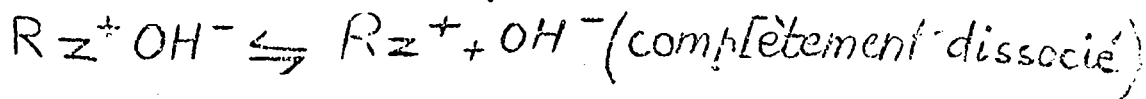
Résines fortement basiques (Amberlite IRA 400 et 410, Dowex 2, Deacidite 300).

Il existe entre les 2 types de résines à échange d'ions les mêmes différences qu'entre l'ammoniaque et la soude :

Amberlite IR 4B

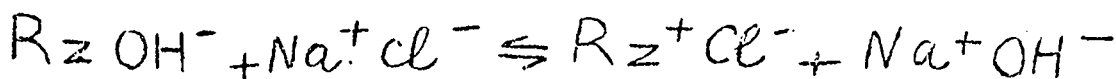


Amberlite IR 400 (OH)

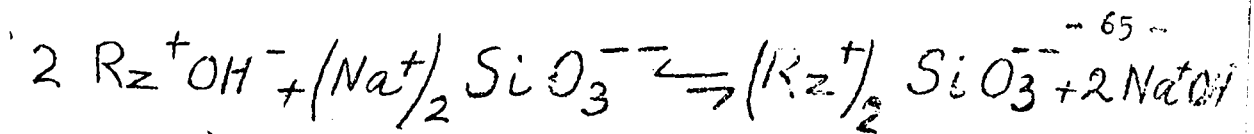


Ces résines fortement basiques peuvent servir à

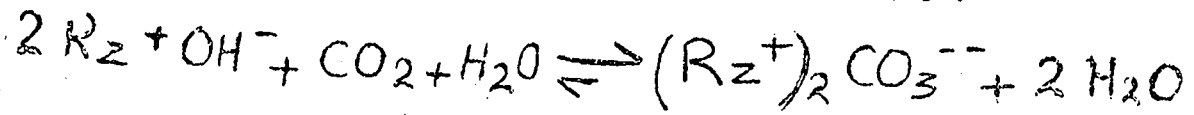
1) scinder les sels neutres :



2) scinder les sels de bases fortes et d'acides faibles :



3) adsorber les anions d'acides faibles :



b) - Applications des résines à échange d'ions à la séparation des mélanges d'acides aminés -

Les échangeurs d'ions, utilisés surtout industriellement pour épurer chimiquement les eaux, sont depuis 1939 employés de façon intensive sur le plan expérimental (séparation des terres rares ou des produits de fission radioactifs provenant des piles à uranium). D'autre part, des résultats très importants ont été obtenus dans la séparation des acides aminés. Dans ce domaine, trois types généraux de techniques peuvent être utilisés :

- l'analyse par déplacement (PARTRIDGE),
- l'analyse par élution (28.),
- le fractionnement de base d'un hydrolysat.

I^a) analyse par développement par déplacement :

En 1947, DRAKE [119] , PARTRIDGE [120] eurent l'idée d'appliquer le principe du développement par déplacement (TISELIUS [121] et CLAESON [122]) aux séparations sur résines

- (28.) - Dans l'analyse par élution, une petite quantité du mélange à séparer est adsorbée au sommet de la colonne et entraînée ensuite vers le bas par un système de solvants convenables (méthode de TSWETT). Dans l'analyse par déplacement, le mélange à séparer est adsorbé au sommet de la colonne, puis développé par un agent de déplacement qui est adsorbé de façon beaucoup plus énergique qu'aucun des composants du mélange.

à échange d'ions. Ensuite, PARTRIDGE et coll. [123] ont étudié minutieusement les modalités d'application de la technique en vue de la séparation en groupes des acides aminés d'un hydrolysat.

- Les résines à échange d'anions faiblement basiques (type DEACIDITE 200) ne retiennent que les acides aminés dicarboxyliques (acide aspartique, acide glutamique, acide α - aminoadipique ...). Les acides aminés neutres ne sont pas fixés. De plus, il est possible de déplacer l'acide glutamique et l'acide α - aminoadipique par l'acide acétique N/10 (29.) et l'acide aspartique par l'acide chlorhydrique N/4.

- Sur les résines à échange de cations fortement acides (type PERMUTITE 50 ou DOWEX 50), tous les acides aminés sont retenus et peuvent être déplacés par l'ammoniaque diluée (30.) suivant un ordre qui est en rapport direct avec le pK_I (COOH) des amino-acides (DAVIES [127]).

- Sur les résines à échanges d'anions fortement basiques

(29.) - Au cours de recherches sur les peptides des milieux biologiques (sang, urine, tissu cérébral, etc...) (BOULANGER et BISERTE [124]), nous avons pu démontrer que l'acide pantothénique et l'acide homopantothénique, dans lequel l'acide γ - aminobutyrique remplace la β - alanine, étaient également retenus par les résines faiblement basiques et déplacés par l'acide acétique dilué.

(30.) - Les amides des acides dicarboxyliques (glutamine, asparagine), des sucres aminés (glucosamine), des petits peptides - notamment le glutathion - sont également retenus sur les résines fortement acides (voir BOULANGER BISERTE et COURTOT [125]). Ce type de colonne est très utilisé comme méthode séparative. C'est de cette façon que CRUMPLER, DEPT et WESTALL [126] isolèrent des urines humaines l' α - méthyl- β - alanine (T-Spot).

(type DEACIDITE 300), l'ordre de déplacement des amino-acides par l'acide chlorhydrique dilué dépend étroitement de leur pK_2 (NH_3^+) (PARTRIDGE & BRIMLEY [I28]).

2°) Analyse par élution :

En utilisant l'analyse par élution, STEIN et MOORE ont démontré que les résines à échange de cations fortement acides (DOWEX 50) possédaient un pouvoir de résolution plus grand que les colonnes d'amidon employées en chromatographie de partage quantitative. L'élution peut être réalisée soit au moyen d'acide chlorhydrique de concentration croissante (1.5, 2.5, 4.0 N) (MOORE et STEIN [I29]) (voir également EHRENSVARD et coll. [I30]), soit au moyen de tampons volatils (formiate et acétate d'ammonium de pH compris entre 3 et 7) (HIRS, MOORE et STEIN [I31]), soit par des solutions tampons non volatiles de pH croissant (MOORE et STEIN [I32]). La technique de MOORE et STEIN est parfaitement mise au point pour les amino-acides. Elle nécessite un appareillage complexe pour les amino-acides (circulation d'eau à température constante autour des colonnes, contrôle de la pression d'air appliquée au sommet de la colonne, etc...). Elle demande des manipulations très précises (préparation rigoureuse des solutions-tampons, etc...). Elle exige une constance dans la constitution de l'échangeur d'ions (grande finesse du grain, identité du taux de copolymérisation avec le divinylbenzène,...).

3°) Technique de fractionnement d'un mélange d'acide.

A côté de ces deux méthodes chromatographiques, que nous venons de décrire sommairement, il est possible de réaliser un fractionnement de base d'un mélange d'acides au moyen

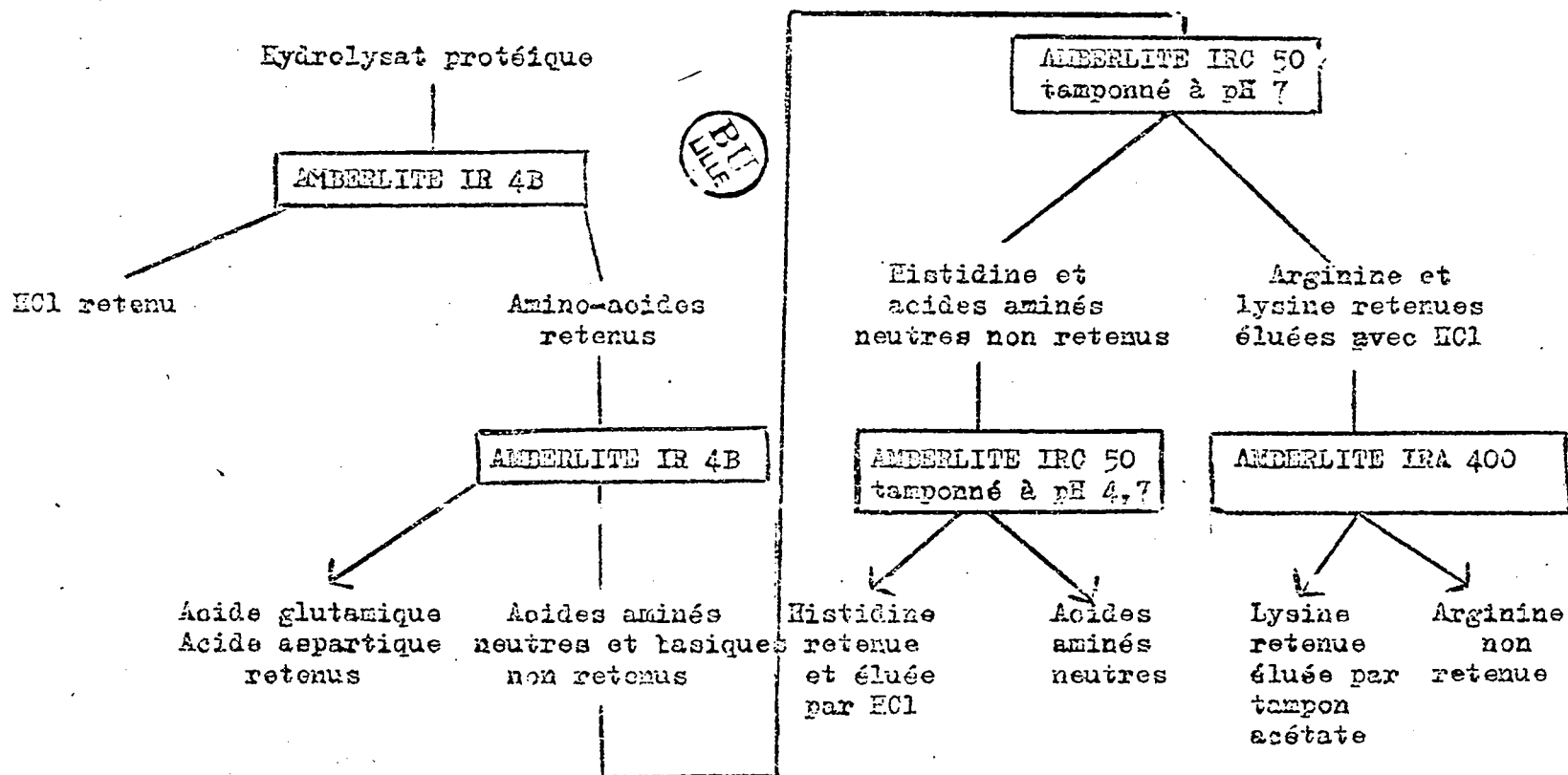
des résines à échange d'ions en utilisant principalement leurs propriétés d'échangeurs ou d'adsorbants.

Cette troisième modalité d'application ne constitue pas véritablement une technique chromatographique. CANNAN [133] sépare les acides aminés dicarboxyliques d'un hydrolysât en utilisant l'Amberlite IR4B. De même SANGER et TUPPY [134], à l'aide de colonne d'Amberlite IR4B équilibrée à pH 3,3 (technique de CONSDEN, GORDON, MARTIN [135]) peuvent isoler les peptides acides des peptides neutres et basiques d'un hydrolysât partiel d'insuline. Enfin, d'après WINTERS et KUNIN [136], le fractionnement complet d'un hydrolysât comporte les diverses étapes résumées dans le tableau IX.

c) - Utilisation des résines à échange d'ions au cours du fractionnement des peptides.

Nous avons songé à appliquer au fractionnement des hydrolysats peptiques les propriétés des résines à échange d'anions et de cations. Il faut tout d'abord préciser que le comportement des polypeptides de poids moléculaire élevé sur les colonnes de résines n'est pas bien connu : en tout cas, il doit être très différent de celui des amino-acides. Les molécules de haut poids moléculaire (comme les protéines) ne sont adsorbées sur les résines (GILBERT et SWALLOW [137], RICHARDSON [138]). PARTRIDGE [139] se sert d'une résine polystyrène-sulfonée à "gros" grains comme d'un "tamis moléculaire" pour séparer les amino-acides et les petits peptides des protéines qui ne sont pas adsorbées sur la résine. En ce qui concerne les protéines d'assez faible poids moléculaire (ribonucléase, cytochrome C, hormone adrénocorticotrope, etc...), des fractionnements très intéressants ont été réalisés à l'aide d'une résine faiblement acide (Amberlite IRC 50), (HIRS, STEIN et MOORE [140], PALEUS et NEILANDS [141], DIXON

TABEAU II



et coll. [I4I bis]).

Quel mode opératoire pouvions-nous utiliser pour effectuer le fractionnement d'un mélange de polypeptides ?

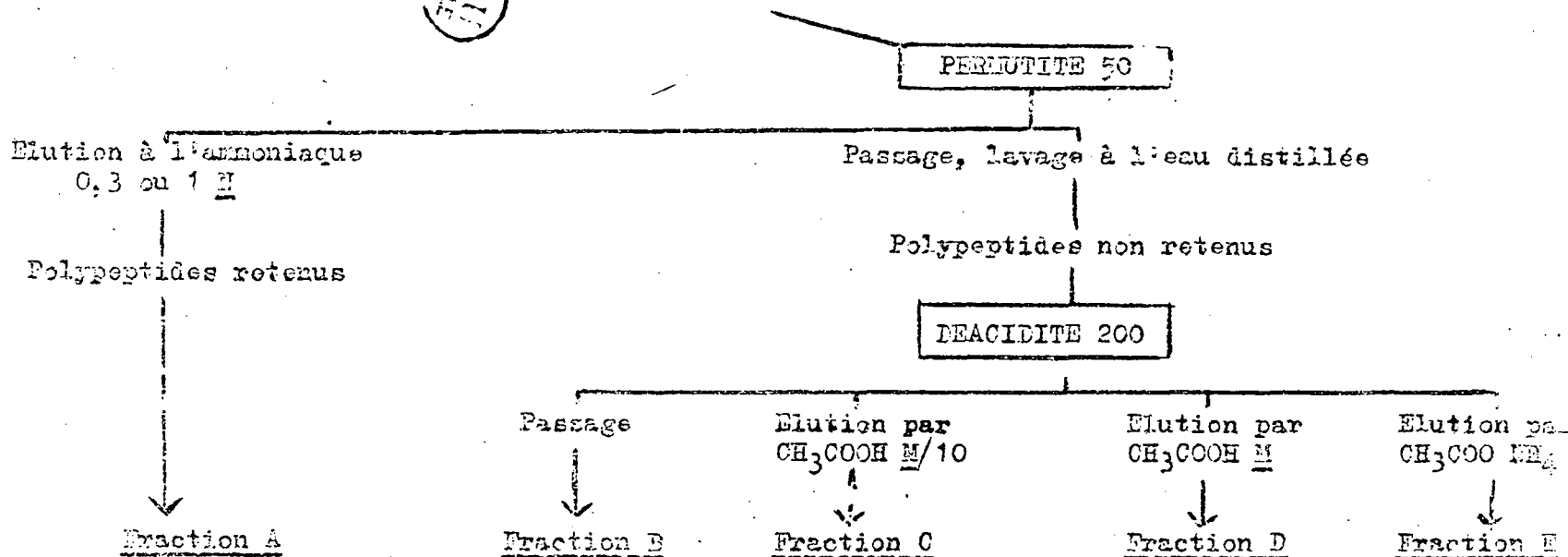
La méthode d'analyse par élution n'a pas encore été appliquée aux polypeptides. Toutefois, d'après MOORE et STEIN eux-mêmes, elle paraît utilisable pour un tel fractionnement à condition d'utiliser une résine fortement acide possédant un faible degré de copolymérisation par le divinylbenzène (2 à 4 p.100) et des tampons volatils.

Avec les échantillons de résine que nous possédions, il ne nous a pas été possible de retrouver dans leur ensemble les résultats obtenus par PARTNIDGE au moyen de l'analyse par déplacement des hydrolysats de protéines.

Nous avons donc été amené à opérer simplement un fractionnement de base du mélange polypeptique en passant successivement la solution sur des colonnes de Permutite 50 et de Deacidite 200. La marche générale du fractionnement est schématisée dans le Tableau X.

TABLEAU I

MELANGE DE POLYPEPTIDES



PERMUTITE 50

Diamètre de la colonne : 16 mm
 Hauteur de la colonne : 25 à 40 cm
 Grain compris entre les tamis n° 25 et 30
 Régénération de la colonne avec $\text{HCl } 2 \text{ N}$
 Lavage de la colonne à l'eau distillée
 jusqu'à résistivité constante du liquide
 effluent
 Vitesse de passage : 40 à 60 ml/heure

DEACIDITE 200

Caractéristiques de la colonne : identiques à la
 précédente.
 Grain : 25-30 :
 Régénération à l'acétate de sodium $\text{N}/4$
 Vitesse de passage : 20 à 30 ml/heure

III - L'ANALYSE PAR DEVELOPPEMENT PAR DEPLACEMENT :

Parmi les procédés les plus efficaces pour la séparation des mélanges de peptides complexes, il faut ranger les méthodes chromatographiques fondées sur le développement par déplacement ("displacement development analysis") et le déplacement par transporteur ("carrier displacement chromatography").

a) Principes des méthodes :

α) Dans le cas du développement par déplacement, (TISELIUS) [I42], le déplacement est effectué par une substance qui est adsorbée plus fortement que tous les autres constituants du mélange étudié (31.). Cette substance développe à l'intérieur du tube une succession de zones contiguës ("procession of adjoining zones"), contenant chacune un composant pur. La largeur des zones est proportionnelle à la quantité du composant. Toutefois, au cours de cette analyse, les zones sont en contact assez étroit, contrairement à l'analyse par élution où les zones sont séparées par de larges espaces vides. Il se produit inévitablement des mélanges aux frontières et des empiètements d'une zone sur l'autre. C'est pour remédier à cet inconvénient que TISELIUS et HAGDAHL [I42 bis] ont préconisé le procédé suivant.

β) - Analyse par déplacement par transporteur -

(31.) - Le même principe d'analyse a été appliqué par PARTNIDGE aux colonnes de résines à échange d'ions (voir plus haut).

Si l'on soumet par exemple une solution aqueuse d'un mélange d'alcools homologues à une analyse par déplacement sur une colonne de charbon, on obtient un certain nombre de zones successives. Si le système contient également un mélange d'acides aminés, par exemple, chacun de ces amino-acides se place entre les zones de deux alcools dont l'un a une affinité d'adsorption inférieure, l'autre supérieure à celle de l'acide aminé. La distance entre deux acides aminés dépend de la quantité d'alcool interposée (voir figure 24).

Sur le plan expérimental, ces séparations sont exécutées avec profit sur des colonnes chromatographiques en "sections" où la "correction du front" est réalisée grâce à la réduction du diamètre dans les parties inférieures de la colonne (CLAESSON et HAGDAHL [143]). Les segments de colonne sont construits en acier inoxydable ou en polythène.

b) Modalités d'application de la technique :

α) - analyse par développement par déplacement :

L'adsorbant est constitué par un mélange d'une partie de charbon (Carboraffin Supra) (32.) et de 3 ou 9 parties d'Hyflo-Super-Cel. Le rôle de l'Hyflo-Super-Cel est de faciliter l'écoulement. Le mélange mouillé par de l'acide chlorhydrique $N/10$, est versé dans une colonne à sections (type CLAESSON). Comme nous ne disposons pas de ce type de colonne, nous utilisons habituellement le dispositif schématisé sur la figure 25. L'écoulement se fait sans pression additionnelle. Les fractions (1 à 2 ml) sont collectées au moyen d'un appareil automatique (33.). Les peptides dissous dans $HCl\ N/10$

(32.) - Nous utilisons l'Activit XL 50.

(33.) - Rappelons qu'il existe 3 types d'appareils collecteurs. Les tubes à essais sont disposés sur un plateau horizontal qui tourne automatiquement dès que l'on a recueilli un nombre de gouttes fixé à l'avance, (a), au bout d'un temps fixé (b) ou lorsque le tube contient un poids de solvant déterminé (c).

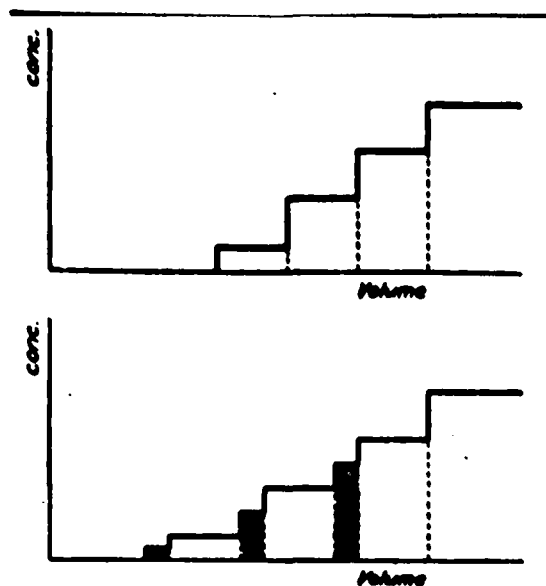


FIG 24

Principe de l'analyse par déplacement par transporteur.

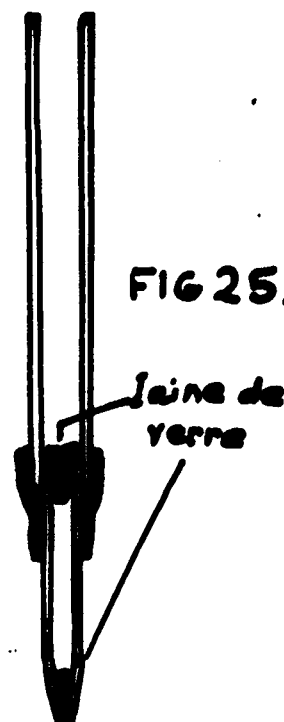


FIG 25.

Colonne à sections.

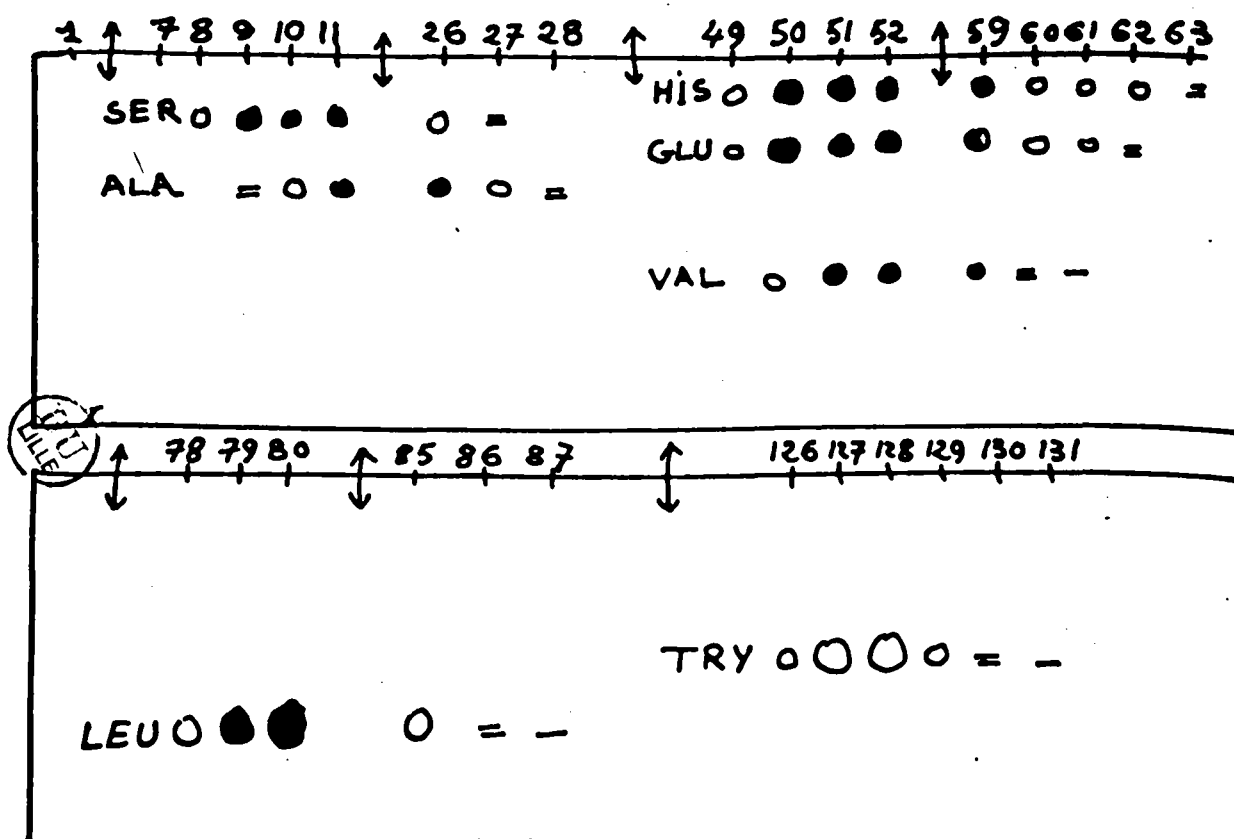


FIG 26

Séparation de 7 amino-acides par analyse par déplacement par transporteur.

sont d'abord passés sur la colonne, puis le développement est assuré par une solution à 0,4 p.100 (ou à 1 p.100) de chlorure de Zephiran (34.) dans l'acide chlorhydrique $N/10$ (LI, TISELIUS et coll. [144]). Nous utilisons comme agent de développement le "CEQUARTYL", de formule analogue.

b) - Analyse par déplacement par transporteur :

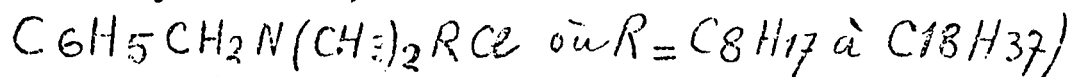
CLAESON [145] a montré que dans une série homologue d'alcools, le degré d'adsorption augmente en fonction de l'augmentation du point d'ébullition. Cette règle peut également s'appliquer aux alcools isomériques possédant des groupes fonctionnels semblables (exemple : alcools amyliques isomères) et HALL et TISELIUS [146] ont montré qu'on pouvait l'étendre aussi aux acides isomères aliphatiques.

Exemple : acide 2-méthyl-propionique	: $E_{760} = 154,4^{\circ}C$
	Volume de rétention = 9 (35.)
acide n-butyrique	: $E_{760} = 163,5^{\circ}C$
	Volume de rétention = 18,5

Dans les expériences de TISELIUS, ce sont les alcools qui ont été choisis comme agents transporteurs. On peut naturellement envisager l'utilisation d'autres systèmes à condition qu'ils soient inertes et facilement séparables des amino-acides ou des peptides.

Au cours de l'opération, il est facile de suivre l'ap-

(34.) - Le chlorure de Zephiran est le chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium, dont la formule est la suivante :



(35.) - Le volume de rétention représente la quantité de solution contenant le composé à une concentration déterminée qu'il est nécessaire de faire passer sur la colonne pour obtenir sa saturation.

parition des alcools, car le passage des acides aminés ou des peptides est souvent délicat à saisir au moyen du dispositif de micro-interférométrie de TISELIUS et CLAEISSON [147], à cause de leur faible concentration dans le liquide efférent. Les alcools peuvent être identifiés au moyen de la méthode xanthogénique de TSCHUGAEFF, qui ne provoque pas de transpositions moléculaires. Les xanthates ou xanthogénates de potassium

$C_n H_{(2m+1)} O_{\overset{K}{\underset{S}{\text{---}}} C=S}$ sont séparés par chromatographie de partage sur papier dans le butanol (2 p.100 KOH) (KARIYONE [148]).

L'adsorbant est constitué par un mélange de charbon et d'Hyflo-Super-Cel dans le rapport 1 : 1 ou 1 : 3.

La série homologue d'alcools est préparée à la concentration de 1 p.100 (en volumes) dans l'acide chlorhydrique N/10.

Exemple d'application à un mélange d'amino-acides :

- Colonne contenant un mélange de 2 g. d'Activit X L 50 et 2 g. d'Hyflo-Super-Cel. Diamètre de la colonne : 8 mm.
- Appareil collecteur réglé à 0,7 g.
- Vitesse d'écoulement : 2 à 3 ml/heure.
- Mélange de 0,5 mg de sérine, d'alanine, de valine, d'acide glutamique, d'histidine, de leucine et de tryptophane dissous dans 12 ml d'un mélange à parties égales de méthanol, éthanol, isopropanol et butanol tertiaire à 1 p.100 (en volumes) dans l'acide chlorhydrique N/10.

Après le passage de la solution d'amino-acides, on fait passer 5 ml de butanol secondaire à 1 p.100 (en volumes) dans HCl N/10, 5 ml de butanol normal à 1 p.100 (en volumes) dans HCl N/10, puis un mélange à parties égales d'alcool isopropylique (E = 129/1312C) et d'alcool benzylique à 1 p.100 (en volumes) dans HCl N/10.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans la Figure 26. Le mélange d'acides-amino a été séparé en quatre groupes bien distincts :

- 1) - sérine et alanine,
- 2) - histidine, glutamique, valine,
- 3) - leucine,
- 4) - tryptophane.

Dans le cas des polypeptides, on peut utiliser un système transporteur comprenant l'alcool n-octylique, l'alcool n-nonylique, l'alcool n-décylique, à la concentration de 1 à 2 p.100 dans l'alcool éthylique à 50 p.100 dans HCl N/10. LI et TISELIUS [149] , LI, ASH et PAPKOFF [150] ont notamment utilisé cette technique pour le fractionnement des peptides obtenus au cours de l'hydrolyse peptique de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH).

IV - LA SEPARATION SOUS L'ACTION D'UN CHAMP ELECTRIQUE

Les différences entre les vitesses de migration dans un champ électrique sont couramment utilisées pour séparer des substances difficiles à purifier par d'autres méthodes physiques ou chimiques. On donne généralement le nom d'IONOPHORESE à la migration d'ions relativement petits, tandis que le terme d'ELECTROPHORESE est réservé aux molécules de grande taille et aux particules microscopiques (MARTIN et SYNGE [151]).

De nombreuses techniques ont été proposées et SVENSSON [152] distingue d'une façon générale les appareils à compartiments et les dispositifs à frontière mouvante. Dans cette dernière technique, la stabilisation des frontières peut être réalisée par la pesanteur (électrophorèse type "TISELIUS"), ou par un agent inerte qui possède la structure d'un système capillaire : gel de silice (CONSDEN [153]) et gel de celite (GARDELL [154]), gel d'agar (GORDON [155]), amiante, coton (BUTLER [156]) ; mais sans contredit l'agent stabilisant le plus favorable est le papier-filtre. WIELAND [157], CREMER et TISELIUS [158], DURRUM [159], BISELTER [160], TURBA et ENENKEL [161] furent les premiers à décrire les modalités techniques de l'électrophorèse sur papier.

a) électrophorèse sur papier :

De nombreux dispositifs ont été décrits. La figure 27 représente un modèle d'appareil particulièrement simple à construire. Les bandes rectangulaires de papier (Whatman n° 1 ou Munktell n° 20/150), qui ont 25 cm. de longueur sur 2 à 6 cm. de large, sont imbibées par la solution-tampon choisie (tampon véronal M/10, phosphate M/20 ou acétate M/5), qui remplit également les deux vases à électrodes. L'anode est en charbon et la cathode en platine. La source de courant est constituée par un redresseur muni d'un filtre, qui peut débiter un courant continu variant de 150 à 450 volts. Un voltmètre et un millampèremètre permettent de préciser à chaque instant les conditions expérimentales. Après un certain temps de passage du courant (2 à 8 heures), les bandlettes sont séchées horizontalement pendant 15 minutes à l'étuve à 100°C et révélées à l'aide de réactions appropriées (alocarmin et bleu de bromophénol pour les protéines, réaction du biuret, de la ninhydrine et de PAULY pour les polypeptides).

- 79 -

DURRUM [162] a décrit un dispositif d'électrophorèse bidimensionnelle utilisant deux tampons volatils (NH_4OH et CH_3COOH) de construction très simple et dont les résultats sont très satisfaisants.

Sur le plan théorique, Mc DONALD et coll. [163], qui ont étudié de façon très précise les différents facteurs qui influencent la migration sur le papier des particules chargées soumises à un champ électrique, résument leurs observations de la façon suivante :

1°) Le mouvement est une fonction linéaire du temps.

Cette constatation ne nous paraît valable que pour des temps de passage du courant assez courts. En effet, il se produit une évaporation uniforme tout le long du papier, qui maintient constant le gradient de potentiel, mais qui provoque un siphonage régulier du tampon à partir des vases à électrodes vers le milieu de la bande de papier. A partir d'un certain moment, comme le signale très justement DURRUM [164], on atteint un équilibre de mobilité (voir figure 28.).

2°) La vitesse du mouvement est directement proportionnelle au voltage appliqué.

3°) A force ionique du tampon constante, à température, potentiel et temps de passage constants, l'électrophorèse est utilisable pour la détermination du point isoélectrique. Il faut toutefois se référer à des témoins bien définis dont le point isoélectrique est déterminé (sérum-albumine par exemple) à cause des phénomènes d'électroendosmose, qui se produisent au cours de l'électrophorèse.

4°) La mobilité augmente avec la diminution de la force ionique du tampon utilisé.

Variations de la méthode :

Une variante très ingénieuse de la méthode DURRUM

[165] consiste à associer la séparation par chromatographie de partage et l'électrophorèse sur papier (38.).

La chromatographie est réalisée sur une bandelette de papier dont la largeur est de 5 à 7 mm. Après séchage, la bandelette est appliquée soigneusement sur un rectangle de papier (40 x 25 cm.) imbibé de tampon et dont les deux extrémités de la grande dimension reposent dans deux vases à électrodes. Après un certain temps de passage de courant (2 à 4 heures sous 500 à 1000 volts), le papier est séché et révélé.

Nous avons utilisé avec beaucoup de profit cette élégante technique. L'électrophorèse sur papier et ses variantes peuvent constituer à la fois une méthode analytique et séparative d'un mélange de peptides.

b) Fractionnement ionophorétique dans une cellule à compartiments :

Il s'agit surtout d'une méthode préparative très précieuse. Le fractionnement repose sur les différences des points isoélectriques des amino-acides ou des peptides. De nombreux types de cellule ont été décrits. Nous utilisons un appareil construit suivant les données d'ALBANESE [167], mais comportant quatre compartiments (A, B, C, D) (voir Figure 29). L'appareil est en bois recouvert d'un vernis imperméable. Les compartiments A, B, D ont une capacité de 100 ml, C une capacité de 50 ml. Le refroidissement est assuré par une circulation d'eau. L'anode est une plaque en charbon, la cathode une plaque en platine ; les deux électrodes sont placées contre les deux membranes

(38.) - HAUGAARD et KRONER [166] ont décrit une méthode d'électro-chromatographie qui ne donne pas de résultats satisfaisants.

terminales.

La nature des membranes séparant les compartiments joue un rôle prédominant. En tenant compte de leur sélectivité électrochimique, on peut, en effet, distinguer 3 catégories de membranes : positive, négative (collodion, cellophane), amphotères (protéines). Parmi les nombreuses combinaisons qui ont été proposées, nous avons utilisé de préférence celles de SYNGE [168] et de SANGER & TUPPY [169] .

- SYNGE : les membranes terminales sont de cellophane, la membrane centrale en parchemin de peau de mouton formolé.

- SANGER : la membrane du côté anodique est en cellophane, la membrane centrale et la membrane du côté cathodique en gélatine formolée. Nous préférons la combinaison de SANGER. La préparation des membranes de gélatine se fait en imbibant un fragment de toile de lin par une solution chaude de gélatine à 10 p.100. Après égouttage et séchage à température du laboratoire, les membranes sont immergées pendant 12 heures dans une solution de formol du commerce diluée au quart. Après lavage et séchage les membranes sont prêtes à l'emploi.

Au cours de l'opération, le compartiment cathodique (D) contient 60 ml d'ammoniaque aqueuse (1,7 p.100 (en volumes)). Le compartiment anodique (A) est rempli avec 60 ml d'acide sulfurique 0,1 N, tandis que le compartiment voisin (B) contient 60 ml d'acide acétique à 0,5 p.100 (en volumes) pour maintenir la conductivité. La solution à analyser (30 ml), qui est placée dans le compartiment (C), est maintenue à un pH déterminé pendant toute la durée de l'opération. La vérification du pH se fait par des réactions à la touche au moyen d'indicateurs colorés (vert de bromocrésol, bromocrésol pourpre). L'ajustement est effectué par l'addition d'ammoniaque à 5 p.100 (en

volumes) ou d'acide acétique dilué dans le compartiment (C). Dans le cas des acides aminés, lorsque le pH du compartiment (C) est maintenu entre 6,0 et 7,0, on obtient une séparation parfaite en 3 groupes : acides (compartiment (B)), neutres (compartiment (C)), et basiques (compartiment (D)). Au contraire, lorsque le pH est ajusté à 4,6, le compartiment cathodique contient, en plus des acides aminés basiques, une certaine quantité d'acides aminés neutres ou d' β -amino-acides (β -alanine, acide γ -aminobutyrique). L'addition du compartiment spécial (A) du côté anodique permet d'effectuer directement le fractionnement ionophorétique sur les hydrolysats protéiques : car les acides forts se dirigent en effet vers ce compartiment. Au cours de l'opération, il y a souvent intérêt à remplacer l'ammoniaque diluée du compartiment (D) : notamment au cours des ionophorèses de longue durée, pour éviter la décomposition des amino-acides ou des peptides basiques. D'autre part, comme on ajoute régulièrement de l'ammoniaque dans le compartiment (C) pour maintenir le pH et comme il peut exister des bases fortes dans l'échantillon à analyser, il peut se produire dans le compartiment cathodique des variations de pH importantes qui gênent l'entrée des peptides faiblement basiques et qui nécessitent donc le remplacement du contenu de ce compartiment.

Le potentiel appliqué aux premiers stades de l'expérience est de l'ordre de 100 volts. Généralement, au bout de 20 à 30 minutes, il est possible d'augmenter ce potentiel jusqu'à 150 - 200 volts. Enfin, au bout d'un temps variable, (1 à 2 heures), l'intensité du courant baisse et se stabilise finalement à une valeur de 30 à 40 mA.

L'opération est terminée et il suffit de collecter le contenu des compartiments B, C, D.

Conclusion :

Telles sont les méthodes que nous avons été amené à mettre au point en vue du fractionnement des hydrolysats peptiques de cristalbumine. Un dernier type de méthode aurait été susceptible de nous donner des résultats très intéressants : il s'agit de la distribution à contre courant (CRAIG [170]), qui nécessite un appareillage complexe que nous n'avons pu nous procurer.

CHAPITRE D

ESSAIS DE FRACTIONNEMENT D'UN HYDROLYSAT PEPSIQUE

Après la mise au point des techniques décrites dans le chapitre précédent, nous avons réalisé de très nombreux essais pour établir un plan de fractionnement. Tout d'abord en tenant compte du fait que l'hydrolysat pepsique de la cristalbumine est constitué vraisemblablement par un mélange de polypeptides de poids moléculaires sensiblement différents, nous avons songé que l'on pouvait réaliser, au départ, une précipitation fractionnée à l'acide trichloracétique. En effet, nous utilisons de préférence les conditions d'hydrolyse pepsique préconisées par CURRIE et BULL [171] (type n° 2, voir page 17), qui favorisent l'accumulation des peptides de faible poids moléculaire (2000 environ) au détriment de l'apparition des gros fragments de poids moléculaire de l'ordre de 30.000. CURRIE et BULL séparent ces deux groupes par un fractionnement à l'acide trichloracétique à 6,5 p.100.

D'autres auteurs ont également utilisé la précipitation trichloracétique pour purifier ou simplifier leurs mélanges polypeptidiques. LI, ASH et PAPKOFF [172] ont montré que les polypeptides "physiologiquement actifs" résultant de l'hydrolyse pepsique de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) se localisaient dans la fraction précipitée entre 5 et 25 p.100 d'acide trichloracétique ; les autres fractions ne sont pas "actives".

Précipitation fractionnée à l'acide trichloracétique :

Après enlèvement de la cristalbumine par coagulation à la chaleur à pH 4,8 pendant 3 minutes, on ajoute à l'hydrolysât pepsique filtré de l'acide trichloracétique à 50 p.100 pour obtenir une concentration finale de 5 p.100. Le précipité (P_I) formé est séparé par centrifugation. En amenant la concentration en acide trichloracétique du filtrat à 6,5 p.100, il se produit un nouveau précipité (P_2). Cette opération est répétée trois fois successives pour les concentrations de 10, 15 et 20 p.100. Les précipités (P_I , P_2 , P_3 , P_4 , P_5) ainsi obtenus et remis en suspension aqueuse, ainsi que le filtrat final (F 5), sont soumis à trois extractions à l'éther sulfurique pour enlever l'acide trichloracétique.

Un bilan azoté a pu être établi au cours de cette précipitation fractionnée, dont les résultats sont rassemblés dans le Tableau XI.

- TABLEAU XI -

Fractions	Taux de précipitation à l'acide trichloracétique	Quantité totale d'azote dans la fraction (en g.)	Pourcentage
P_I	5 p.100	0,390	18,6
P_2	6,5 p.100	0,185	8,8
P_3	10 p.100	0,312	14,9
P_4	15 p.100	0,156	7,4
P_5	20 p.100	0,067	3,2
F 5	-	0,980	46,8
TOTAL		2,090	

87

Le filtrat (F_5), non précipité à une concentration de 20 p. 100 en acide trichloracétique, constitue environ 50 p. 100 de l'azote polypeptidique total : il est constitué vraisemblablement par les polypeptides possédant le plus faible poids moléculaire. C'est donc la partie que l'on peut fractionner le plus facilement et c'est à son étude que nous avons principalement consacré nos efforts. Le tableau XII représente le schéma général de fractionnement de cette fraction.

Le précipité P_I représente les polypeptides de poids moléculaire élevé (30.000). Nous n'avons pas encore étudié cette fraction, qui représente environ 20 p. 100 de l'azote polypeptidique. Son étude ne peut être abordée qu'après une nouvelle simplification par une seconde hydrolyse enzymatique.

Les précipités P_2 , P_3 , P_4 , P_5 sont des mélanges complexes. Leur fractionnement peut être cependant entrepris.

TABLEAU XII

PLAN GENERAL DE FRACTIONNEMENT DES POLYPEPTIDES

"SIMPLES"

Les abréviations suivantes ont été employées :

A,B,C,D	: nomenclature des fractions polypeptidiques après "chromatographie" sur résines à échange d'ions ;
PERMUTITE, DEACIDITE	: "chromatographie sur résines à échange d'ions ;
IONO pH 7	: fractionnement ionophorétique avec maintien du compartiment médian (C) à pH 7 ;
AMBERLITE pH 7	: "chromatographie" sur résines à échange d'ions tamponnées à pH 7 ;
C.P.P. I ou 2	: chromatographie de partage uni- (I) ou bidimensionnelle (2) ;
C.P.C. SOLKA FLOC	: chromatographie de partage sur colonne de poudre de cellulose (SOLKA FLOC) ;
C.P.P.S. 2	: chromatographie de partage séparative sur papier ;
"CARRIER"	: chromatographie par déplacement par transporteur ;

FILTRAT F5

PERMUTITE

élution ammoniacale

A

TYPE I

TYPE II

TYPE

III

IONO ph 7

C.P.C.
SOLKA FLOC.

DEACIDITE

n.r.

AMB
IRC

ERLITE
50 ph 7

n.r.

AMBERLITE
IRC 50 ph 4

AMBERLITE
IRA 410

n.r.

basiques

acides
neutres
faiblement
basiques

suite: TYPE II

C.P.P.S. 2

chromato. "couplée"

C.P.P.S. 2

3 zones
4 zones
2 zones
11 zones
5 zones
6 zones
2 zones
5 zones
2 zones
2 zones
4 zones
2 zones
1 zone
4 zones

C.P.P.S. 1 ou 2

IONO ph 7

I II III IV V

passage

DEACIDITE

passage

elution ac. acétique

M/10
C

M/1
D

B

CARRIER

C.P.P.S. 2

IONO ph 3,5

D1 D2 D3

C.P.P.S. 2

6 zones
4 zones
3 zones

A B C
mélange
de 3 à 4
polypeptides

10 zones
7 zones
8 zones

ELUTION, HT, CPP 2

HYDROLYSE

PARTIELLE ACIDE

DNP-AMINO ACIDES,

CARBOXYPEPTIDASE

I) - ETUDE DE LA FRACTION POLYPEPTIDIQUE NON
PRECIPITEE A LA CONCENTRATION DE 20 p.100 EN ACIDE
TRICHLORACETIQUE (FILTRAT F 5)

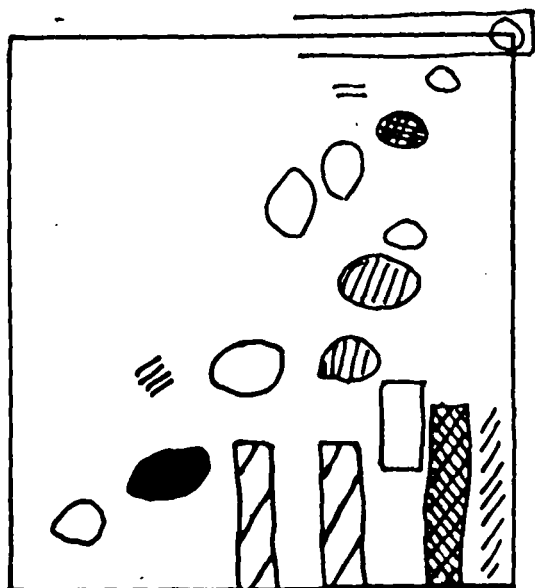
Ce filtrat, après passages successifs sur une colonne de Permutite 50, puis de Deacidite 200, est séparé en quatre fractions principales :

- A (élution à l'ammoniaque de la résine Permutite 50) ;
- B (fraction non retenue sur la Permutite 50 et la Deacidite 200) ;
- C (élution à l'acide acétique N/10 de la Deacidite 200) ;
- D (élution à l'acide acétique N de la Deacidite 200).

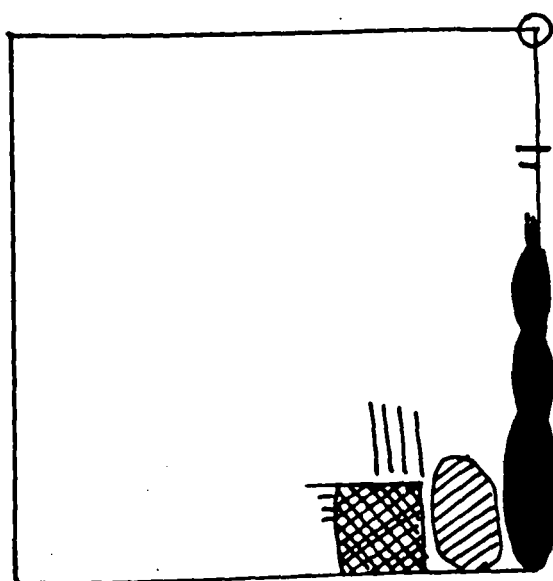
Le comportement chromatographique des diverses fractions est schématisé sur la Figure 31. Les fractions A, C et D sont donc constituées par un mélange de peptides assez facilement séparables par la chromatographie de partage. La fraction B, par contre, est très complexe et ne sera pas étudiée aisément par ce type de chromatographie.

F R A C T I O N A : La fraction A a été soumise à trois types différents de fractionnement (voir tableau XII). En utilisant la méthode de DURRUM (chromatographie sur bandelette de papier et électrophorèse sur papier) il est possible de séparer la fraction A en 30 groupes différents (voir figure 32). Dans un premier temps, nous avons donc essayé de la fractionner en utilisant l'ionophorèse et la chromatographie de partage.

Le T Y P E I de fractionnement que nous avons utilisé comporte donc (voir tableau XII) :

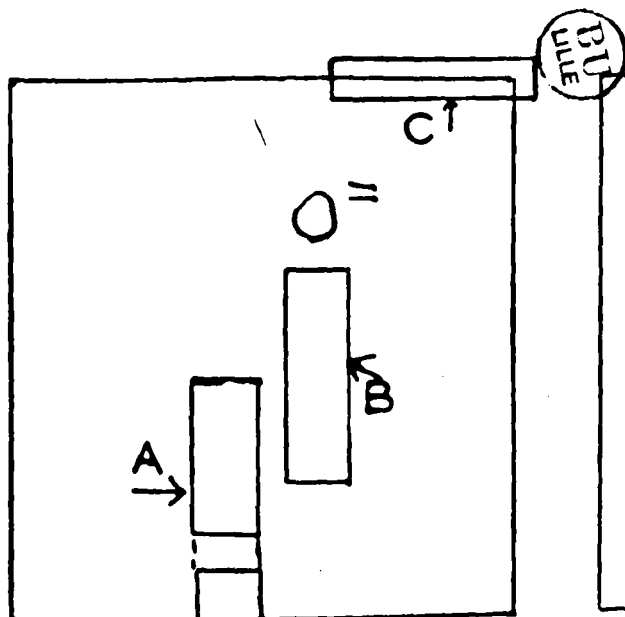


F5 A

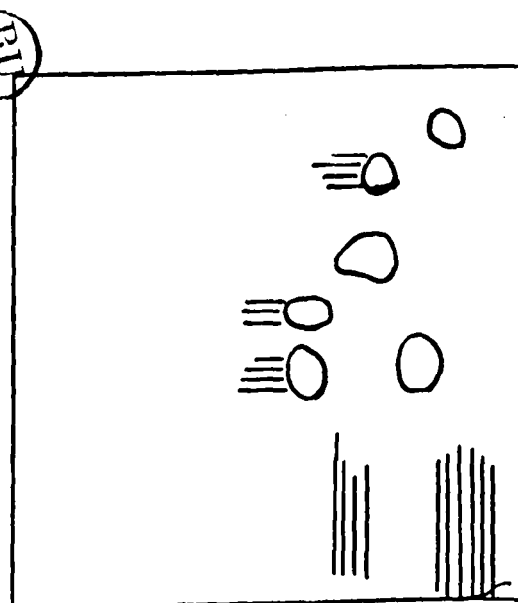


F5 B

Chromatographies schématiques
(Butanol : de droite à gauche,
Phenol : de haut en bas -)



F5 C



F5 D

a) un fractionnement ionophorétique : (durée de l'opération : 90 minutes ; le pH du compartiment median est maintenu entre 6,0 et 7,0) ;

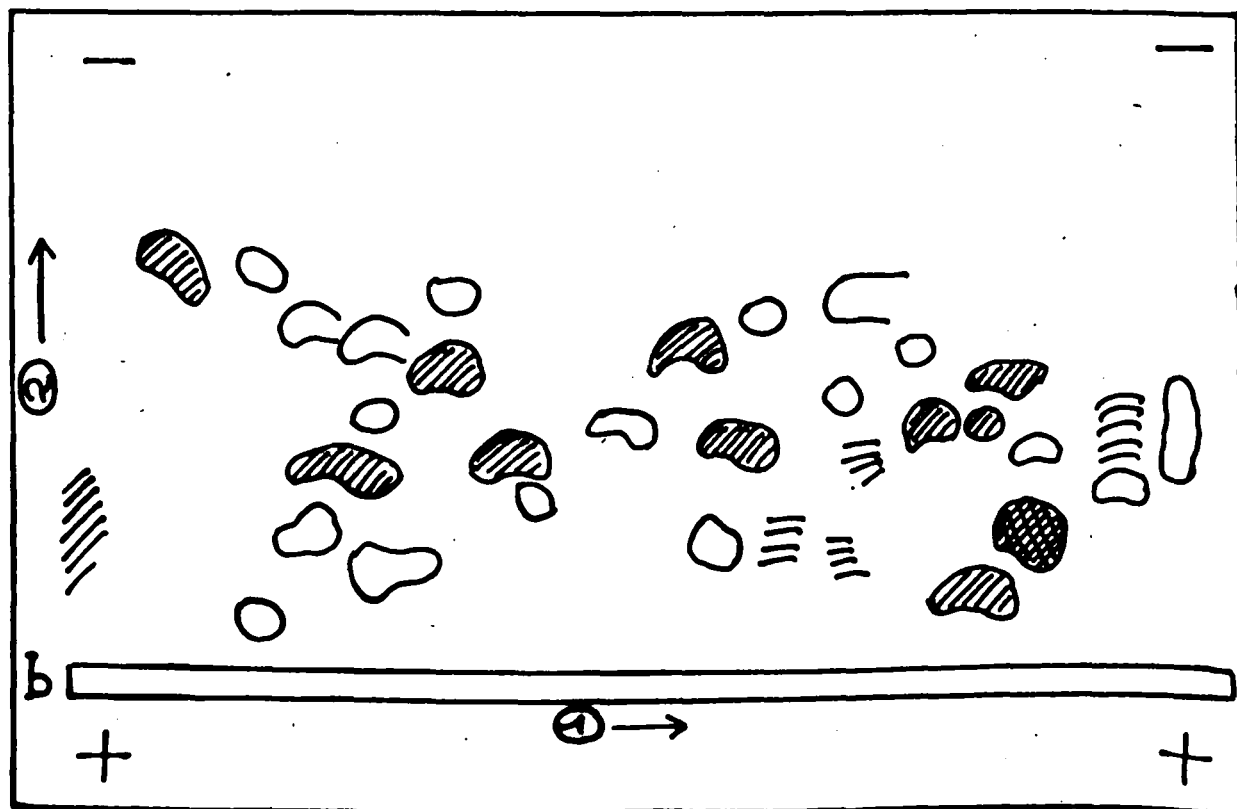
b) une chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes solvant butanol/acide acétique et phénol (NH_3). Seule la fraction anodique donne des chromatogrammes nets (voir figure 33), présentant 20 taches bien séparées. Sur le chromatogramme de la fraction neutre, il est possible de déceler plusieurs plages diffuses minhydrine positive (figure 34). Cette fraction a été étudiée au moyen de la "chromatographie couplée" sur colonne et papier (voir page 58). Les résultats de ce fractionnement sont représentés sur les figures 35. En examinant le schéma, on peut donc conclure que, dans ce cas particulier, la résolution obtenue par ce procédé est plus satisfaisante que celle fournie par la chromatographie bidimensionnelle.

Malgré les résultats intéressants fournis par ce type de fractionnement, les différentes fractions obtenues sont encore trop complexes. Nous avons donc été amenés à adopter le T Y P E II , qui comporte tout d'abord :

a) une chromatographie séparative sur colonne de poudre de cellulose (SOLKA-FLOC) au moyen du butanol-acide acétique. Après contrôle en chromatographie sur papier, les tubes recueillis à l'aide du collecteur automatique sont séparés, d'après leur comportement chromatographique, en 5 sous-fractions (A I, A II, A III, A IV, A V). Ces différentes sous-fractions sont soumises

b) à un fractionnement ionophorétique. Au cours de l'ionophorèse (durée : 1 heure), le pH du compartiment de l'é-

- FIG. 32 - (F5A)



- 1) Chromatographie sur bande (b) dans le butanol
- 2) Electrophorèse (CH_3COOH M/5) (3 heures) (450v.)

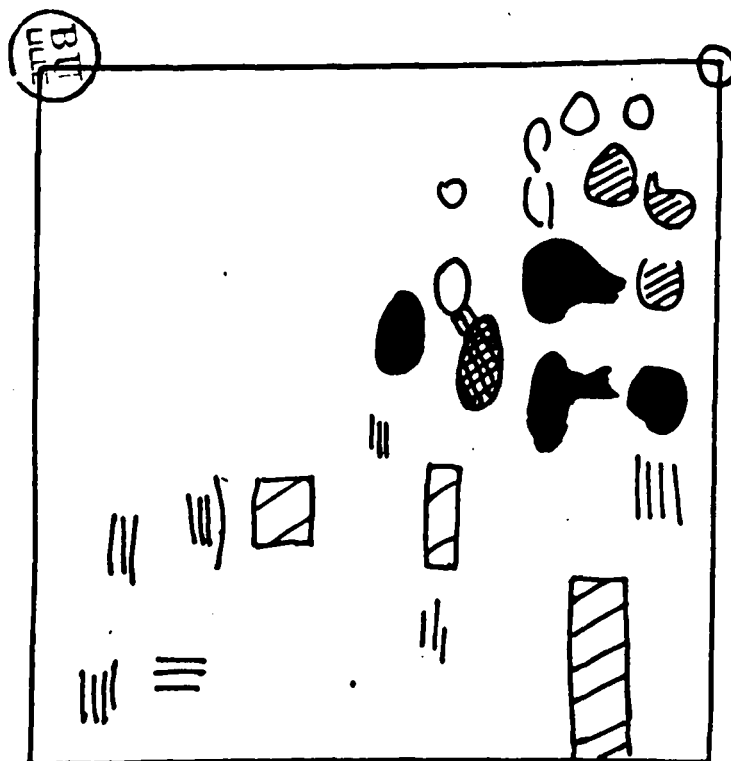
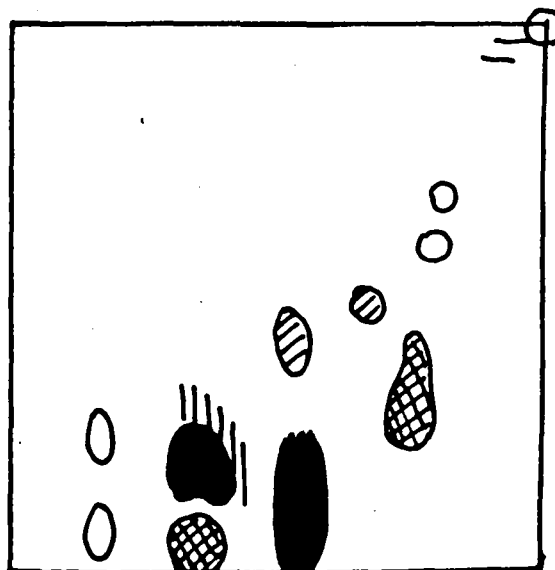
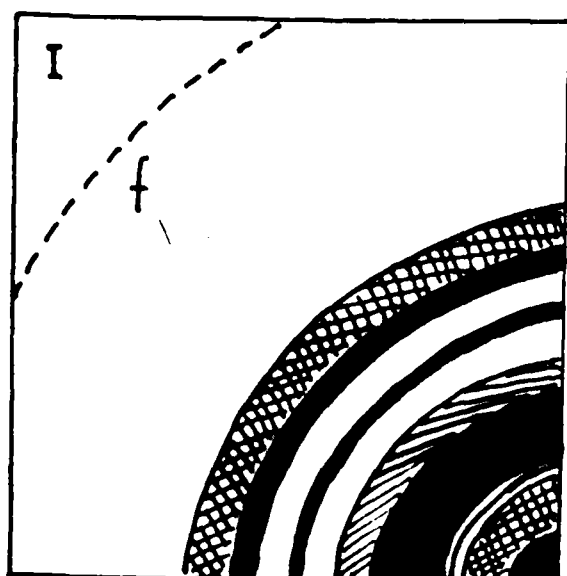


FIG 33 - F5A anode.



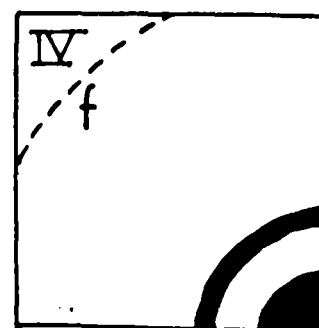
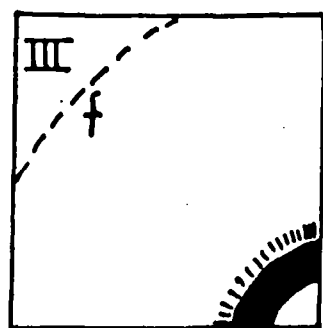
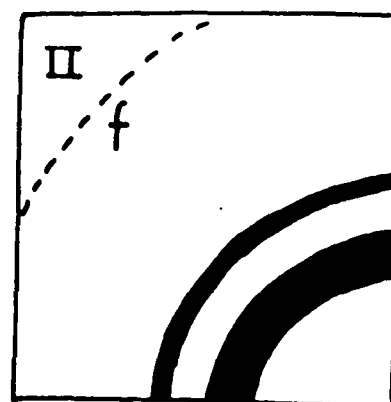
F5 A M

FIG. 34



BU
LILLE

FIG. 35.



F5 A M - chromatographie " couplée "
révélation (ninhydrine) par quadrants -
f = front du solvant. durée : 4 x 24 heures -

chantillon est maintenu entre 6 et 7. Chaque sous-fraction est donc subdivisée en trois (exemple : A I a (anode), A I n (neutre), A I c (cathode)).

c) après évaporation, chacune de ces fractions est étudiée et séparée en chromatographie sur papier (uni- ou bidimensionnelle) dans le système butanol-acide-acétique.

RESULTATS :

- A I : la plus grande partie des polypeptides se trouve dans la fraction A I n qui présente un aspect chromatographique en traînée (R_F 0,50 à 0,70). Il s'agit d'un mélange complexe de polypeptides que nous n'avons pas encore pu fractionner. Il est en effet possible d'identifier plusieurs DNP-amino-acides (DNP-sérine, DNP-glycocolle ou DNP-thréonine, DNP-valine)

- A II : Après chromatographie séparative sur papier uni- ou bidimensionnelle, il est possible d'isoler et de récupérer dans la fraction A II a : II taches, A II n : 5 taches, A II c : 6 taches. La composition des peptides les plus caractéristiques, étudiée par la chromatographie après hydrolyse totale est rassemblée dans le tableau XIII. L'examen de ce tableau nous montre que la caractéristique essentielle des fractions anodiques est leur richesse en acides aminés dicarboxyliques (principalement : acide glutamique), en sérine et glycocolle, en alanine. Les fractions neutres sont essentiellement constituées par de la leucine, de l'alanine, de la sérine, du glycocolle et de l'acide glutamique. Dans les fractions cathodiques, il est intéressant de signaler la présence de cystine.

Les amino-acides portant les groupements carboxyliques libres de la fraction neutre (A II n) ont été déterminés par la

TABIEAU XIII

Composition en Amino-acides des peptides de la Fraction A_{II}

	A _{II} anode										A _{II} neutre					A _{II} cathode		
	A	B	C	E	F	G	H	I	K	A	B	C	D	E	A	B	H	
Acide aspartique	+	<u>8</u>	4	6	<u>10</u>	<u>8</u>	6	2	5	2		+	1	1		+	+	
Acide glutamique	5	<u>15</u>	<u>12</u>	<u>15</u>	<u>20</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>15</u>	<u>10</u>	<u>8</u>	<u>8</u>	<u>20</u>	<u>8</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	
Sérine																		
Glycocolle	3	<u>15</u>	<u>12</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	8	<u>15</u>	6	<u>10</u>	<u>8</u>	6	10	<u>8</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>12</u>	
Thréonine								2	<u>4</u>	2	2	2					1	
Alanine	2	<u>10</u>	<u>8</u>	6	<u>15</u>	<u>15</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	6	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>12</u>	<u>30</u>	<u>10</u>	<u>2</u>		2	
Tyrosine				1	1	2		1	<u>2</u>		1			<u>3</u>				
Valine		<u>6</u>			2	6				4	2	+	5				2	
Léucine	2	4	4	6	<u>10</u>	<u>10</u>	<u>8</u>	10	8	<u>24</u>	<u>12</u>	15	<u>20</u>	20			<u>4</u>	
Phénylalanine		2				4	4				3		5					
Diaminés				4	+					+	1				<u>3</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	
Cystine				<u>2</u>											<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	

Les chiffres représentent les proportions relatives des amino-acides estimés d'après la surface et l'intensité des taches révélées à la ninhydrine. Les chiffres soulignés correspondent aux amino-acides les plus caractéristiques de la composition des polypeptides.

méthode de THOMPSON. Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES PORTEURS D'UN GROUPEMENT CARBOXYLIQUE LIBRE DANS LES POLYPEPTIDES DE LA FRACTION A II n

	A	B	C	D	E
GLU	2			2	
SER		3			
GLY	<u>6</u>	3	4	2	<u>4</u>
ALA				<u>10</u>	
LEU	\ <u>6</u>	<u>1</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	2
PHE		<u>8</u>			

De l'examen de ce tableau, on peut donc conclure que les fractions A, B, C, D, E (A II n) contiennent au maximum deux polypeptides. La phénylalanine de la fraction B peut d'ailleurs se trouver à l'état libre dans l'hydrolysât.

DESNUELLE et ROVERY [174] ont en effet démontré que le seul amino-acide libre que l'on peut identifier dans les hydrolysats peptiques est la phénylalanine.

- A III, A IV - Après le fractionnement ionophorétique, ces fractions n'ont pas été séparées par chromatographie sur

papier ; leur composition globale est donnée dans le tableau XV.

La composition des compartiments anodiques et cathodiques des fractions A III et A IV est extrêmement caractéristique : présence exclusive d'acides aminés dicarboxyliques, d'alanine, de valine et de leucine pour les polypeptides "acides", présence exclusive d'acides diaminomonomocarboxyliques, d'alanine, de valine et de leucine pour les polypeptides "basiques" (voir figures 36).

Le T Y P E II nous fournit donc des résultats très encourageants, mais encore insuffisants. C'est pour cette raison que nous songeons à appliquer

le T Y P E III qui comporte dans un premier temps un fractionnement de base sur diverses résines à échange d'ions (voir tableau XII).

a) utilisation d'une résine faiblement basique (DEACIDITE 200) pour isoler les polypeptides à caractère "acide".

b) utilisation d'une résine fortement basique (Amberlite I R 410) pour isoler et fractionner les polypeptides à caractère "basique".

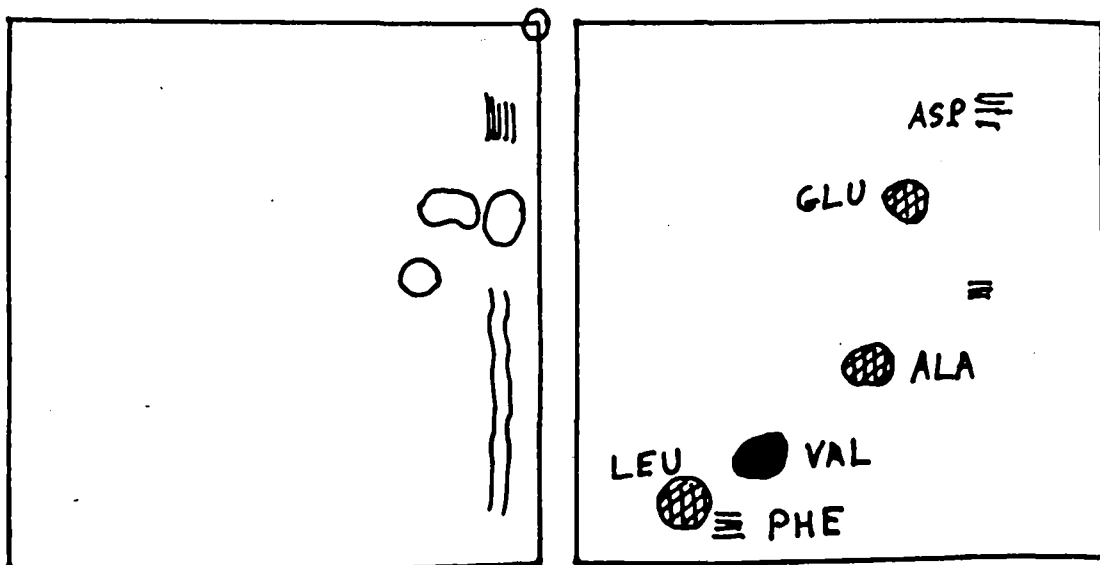
c) utilisation d'une résine faiblement acide (Amberlite IRC 50) tamponnée à différents pH (6,5 et 4,7) pour isoler et fractionner les polypeptides à caractère "faiblement basique" et "neutre".

Après ce fractionnement de base, l'ionophorèse (réalisée à différents pH), la chromatographie de partage (sur colonne et sur papier) sont utilisées comme dans les T Y P E I et II de fractionnement.

TABLÉAU XV

Composition en Acides aminés des Fractions AIII et AIV

	AIII			AIV		
	a	m	o	a	m	o
Acide aspartique	<u>2</u>	4		<u>±</u>	4	<u>±</u>
Acide glutamique	<u>8</u>	6		<u>6</u>	<u>8</u>	<u>2</u>
Sérine		1		) <u>±</u>	2	
Glycocolle		3			2	
Thréonine		2			3	
Alanine	<u>6</u>	<u>10</u>	<u>3</u>	<u>6</u>	<u>12</u>	<u>6</u>
Tyrosine						
Valine	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>8</u>	<u>3</u>
Leucine	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>10</u>	<u>6</u>
Phénylalanine	<u>2</u>	2		2	<u>6</u>	
Lysine		<u>8</u>	<u>4</u>		) <u>8</u>	4
Arginine		1	<u>3</u>			<u>3</u>
Cystine		<u>1</u>			<u>1</u>	
Proline		++			+++	

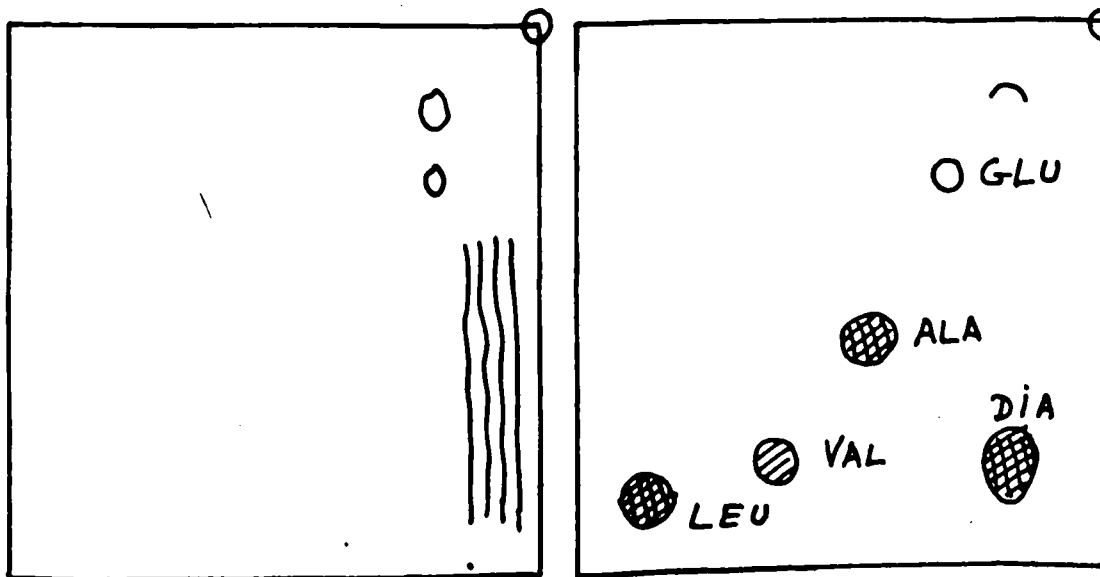


avant HT

F 5

BU LILLE

après HT
anode -



avant HT

après HT
F 5 A IV cathode

- FIG. 36 -

F R A C T I O N B

Ainsi que le démontre la figure 3I, la fraction B ne peut pas être séparée utilement en chromatographie de partage. Nous l'avons donc soumise à un fractionnement par chromatographie par développement par transporteur (carrier displacement) (voir tableau XII).

Conditions expérimentales :

- Colonne : Hauteur = 18 cm., diamètre 8 mm.
- Adsorbant : 1 partie d'Activit XL 50 et 3 parties d'Hyflo-Super-Cel. Après tassement, la colonne est lavée par une solution d'éthanol à 50 p. 100 (en volumes) dans l'acide chlorhydrique N/10. Des solutions d'alcool n-amylique à 1 p. 100 (en volumes), d'alcool n-octylique et n-décylique, à 2 p. 100 (en volumes) sont préparées dans une solution d'éthanol à 50 p. 100 (en volumes) dans l'acide chlorhydrique N/10. Une solution saturée d'alcool laurique dans le même solvant est également préparée. Le mélange de polypeptides est dissous dans 2 ml de la solution d'alcool n-amylique. Après le passage des polypeptides, le déplacement est effectué par 10 ml de la solution d'alcool n-octylique et 75 ml de la solution d'alcool n-décylique et 80 ml de la solution d'alcool laurique. 130 fractions de 1,2 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur automatique et étudiées en chromatographie unidimensionnelle.

3 passages successifs de polypeptides peuvent être observés :

- I) Tubes 8 à 20 (avec un maximum dans les tubes 8 à 13)
- II) Tubes 28 à 38 (avec un maximum dans les tubes 28 à 31)
- III) Tubes 73 à 81.

Le comportement en chromatographie unidimensionnelle

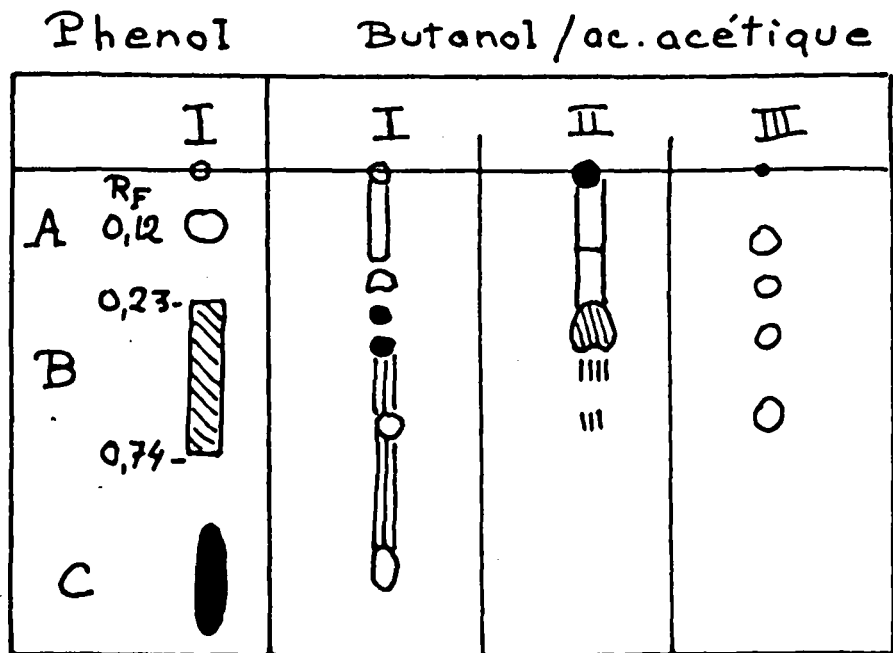


FIG 37-

Etude chromatographique des fractions BI, BII
BIII obtenues par une analyse par déplacement
par transporteur sur charbon - Hyflo-Super-cell

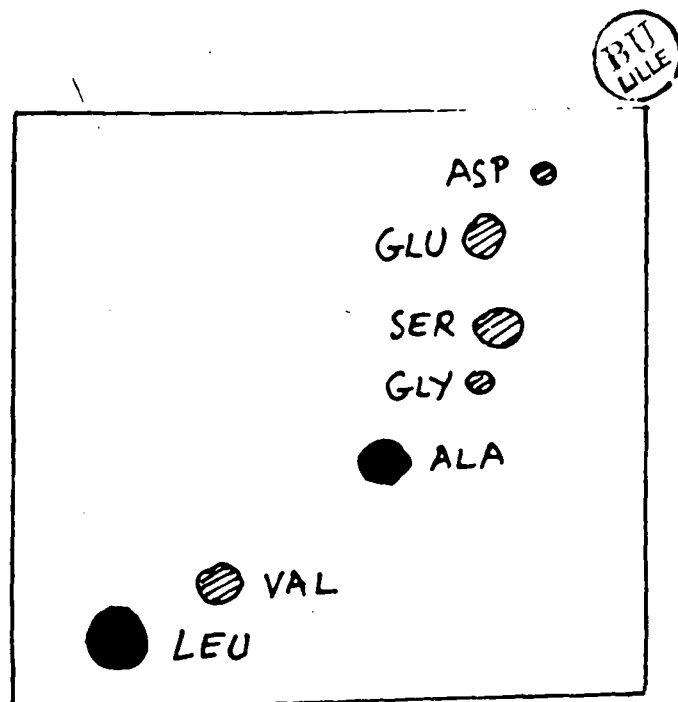


FIG 38

Action de la carboxypeptidase sur les polypeptides
de la fraction BI (zone C, après chromatographie
séparative dans le phenol (NH₃)).

de ces diverses fractions est schématisé sur la figure 37. La fraction I comprend 6 zones complexes ; la fraction II 4 zones, la fraction III 2 à 3 zones.

Après chromatographie bidimensionnelle séparative, ces différentes zones sont repérées, éluées et soumises à une hydrolyse totale. Les résultats obtenus peuvent se résumer de la façon suivante :

F R A C T I O N I :

La chromatographie séparative dans le phénol (NH_3) permet (voir figure 37) de découper trois zones (A, B, C). Chacune de celle-ci est constituée par un mélange complexe de polypeptides. En effet, en utilisant la méthode à la carboxypeptidase de THOMPSON, on identifie pour chaque zone 6 à 8 amino-acides différents (voir figure 38 et tableau XVI).

TABLEAU XVI

PROPORTIONS RELATIVES DES DIVERS AMINO-ACIDES LIBERES PAR
L'ACTION DE LA CARBOXYPEPTIDASE SUR LES POLYPEPTIDES DES
ZONES A. B. C (Fraction B I) (durée d'action 18 heures)

Amino-acides	A	B	C
ASP	2	4	4
GLU	3	6	6
SER	4	2	8
GLY	4	3	4
ALA	2	2	10
THR	I	3	
VAL	±	3	18
LEU	±	3	15

TABLEAU XVII

Proportions relatives des amino-acides des Fractions BII et BIII

	BII				BIII	
	A	B	C	D	A	B
Acide aspartique	2	3	2	1		
Acide glutamique	6	6	3	4	2	2
Sérine	6	2	4	4	2	2
Glycocolle						
Alanine	3	3	4	3	2	
Leucine		2				
Diaminés	4	2	2	1	2	2
Cystine	1	1				

Il est important d'insister sur l'absence des acides diaminomonocarboxyliques. Dans la fraction C, la libération préférentielle de leucine est très caractéristique.

F R A C T I O N S B II et B III

Après élution des 6 zones de la fraction B II et des 2 zones de B III, les polypeptides recueillis sont hydrolysés. La composition en amino-acides des polypeptides les plus caractéristiques de ces fractions est résumée dans le tableau XVII.

En conclusion, le fractionnement par analyse par déplacement par transporteur, associé à une chromatographie séparative unidimensionnelle, permet une résolution nette de cette fraction complexe. Elle est néanmoins encore insuffisante, surtout pour la fraction B I. Une chromatographie séparative bidimensionnelle donnerait d'ailleurs une résolution déjà plus satisfaisante.

F R A C T I O N C - Ainsi que le montre la figure 3I, la fraction C se prête facilement à une séparation par chromatographie bidimensionnelle. Les chromatogrammes sont effectués sur du papier épais (Munktell n° 20/150) de façon à séparer une plus grande quantité de peptides. Après repérage à l'aide de la lumière ultra-violette et d'un chromatogramme-témoin, 3 zones (A, B, C) sont délimitées et éluées (voir figure 3I).

La détermination des groupement aminés libres des polypeptides ainsi séparés a été réalisée au moyen de la micro-méthode d'ACHER, avec identification de DNP - aminoacides suivant la tech-

nique de BISERTE et OSTFUX. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVIII.

TABEAU XVIII

IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES PORTEURS D'UN GROUPEMENT
AMINE LIBRE DANS LES POLYPEPTIDES DE LA FRACTION C

DNP - aminoacides	A	B	C
acide DNP - glutamique ou acide DNP - aspartique	+	+	
DNP - sérine	+	+	+
DNP - glycocolle	+	+	+
DNP - valine	+	+	+

Les zones (A, B, C) ainsi récupérées par chromatographie bidimensionnelle de la F R A C T I O N C, sont donc constituées probablement par des mélanges de 3 à 4 polypeptides. Le fractionnement que nous opérons est donc insuffisant. Il nous faut notamment envisager la séparation des fractions A, B, C par chromatographie de partage (sur colonne, par exemple) dans d'autres systèmes-solvants, le phénol (NH_3) notamment.

La composition globale en amino-acides de cette fraction est rassemblée dans le tableau XIX.

PROPORTIONS RELATIVES DES AMINO-ACIDES DE LA FRACTION C

	A	B	C
ASP	4	8	6
GLU	<u>12</u>	<u>20</u>	<u>15</u>
SER	3	3	3
GLY	8	10	10
THR	3	8	3
ALA	6	8	6
TYR	1	1	2
VAL	8	<u>15</u>	8
LEU	8	2	8
PHE	3		<u>6</u>
DIA	3	2	3

Il est important d'insister sur la richesse en acide glutamique de ces polypeptides : ils possèdent donc un caractère "faiblement acide" qui explique leur comportement sur les résines à échange d'ions. D'autre part, la zone B est très riche en valine, la zone C riche en phénylalanine.

F R A C T I O N D - D'après son comportement sur les résines à échange d'ions, cette fraction polypeptidique possède un "caractère acide". Nous avons donc pensé qu'il était possible de la fractionner par ionophorèse à condition de maintenir le pH du compartiment médian (C) aux environs de 3,5.

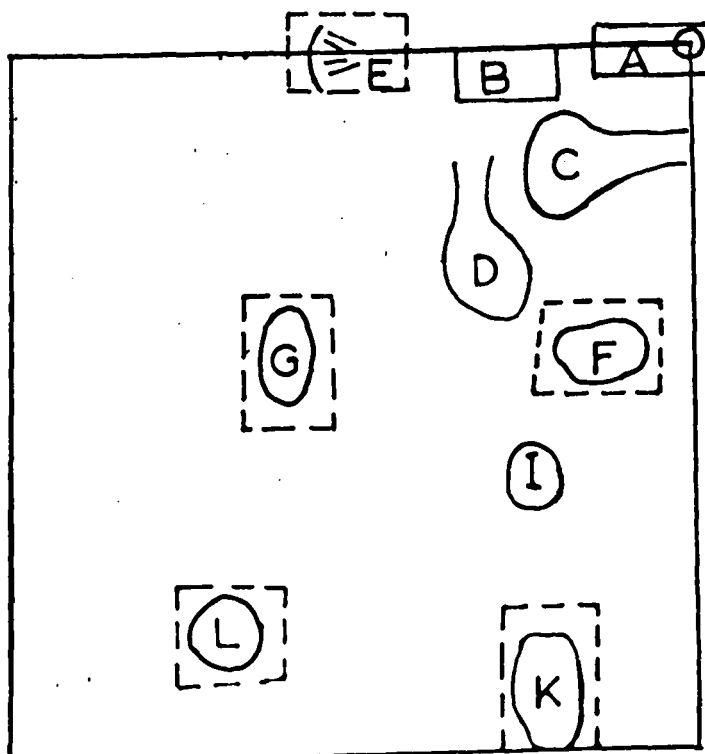
Il est possible ainsi d'obtenir 3 sous-fractions dans les compartiments B (39.), C, D, de la cellule à ionophorèse (DI, D2, D3).

Après chromatographie sur papier uni et bidimensionnelle, DI comprend 10 taches, D2 7 taches, D3 6 taches. La fraction DI, bien que très complexe, est obtenue à l'état cristallisé (voir figure 39 et tableau XII).

La composition en amino-acides de divers polypeptides les plus caractéristiques, obtenue après chromatographie des hydrolysats totaux, est rassemblée dans le tableau XX.

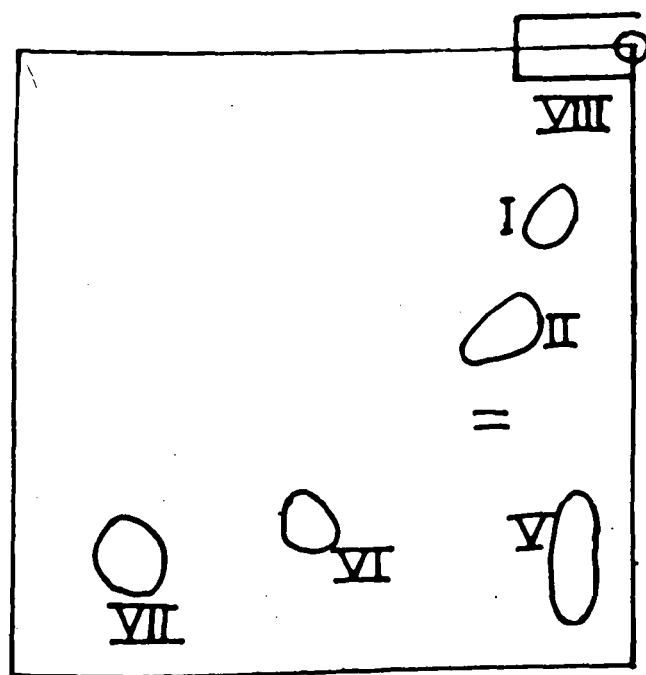
L'examen de ce tableau nous confirme très nettement le caractère acide des polypeptides de la fraction D. Il existe très certainement des enchaînements aspartyl-glutamique ou glutamyl-aspartique. Le rapport acide aspartique-acide glutamique est de 1 : 2, tandis que, dans les peptides de la fraction C, il est de 1 : 3 (voir tableau XIX). Mais il est très curieux de comparer la composition en amino-acides et le comportement en chromatographie bidimensionnelle. Ainsi le peptide ($AD_I L$) est riche en acide aspartique, en acide glutamique, en alanine et en leucine. Il se comporte pourtant comme la leucine. Il est vraisemblablement porteur d'un groupement aminé libre provenant de la leucine : ce qui explique son comportement chromatographique. Le polypeptide $AD_I G$ est également riche en acide aspartique, en acide glutamique et en leucine. Il se situe sensiblement à égale distance de l'acide glutamique et de la leucine sur une droite qui partirait de l'origine du chromatogramme. Son groupement aminé libre terminal est donc différent de celui du peptide

(39.) - Le compartiment B (voir figure 29) est rempli avec 60 ml d'acide acétique à 1 p. 100 (en volumes) (pH : 2,7).

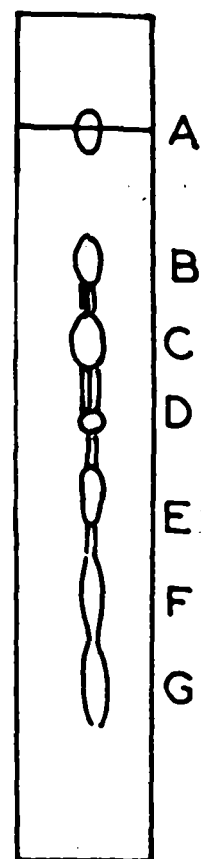


$F5D_1$

BUT
LILLE



$F5D_3$



$F5D_2$

FIG.39 (FRACTION D)

TABLÉAU XX

Composition en Amino-acides des polypeptides de la Fraction D

	AD ₁										AD ₃					AD ₂				
	A	B	C	D	F	G	I	K	L		I	II	VI	VII	VIII	A	B	C	D	F
Acide aspartique	4	4	4	2	2	6	2	2	4	±	1	1	1	1	1	4	10	10	8	5
Acide glutamique	6	8	10	6	3	8	4	4	8	4	3	2	2	2	2	10	20	30	20	30
Sérine	3	±	8	2	2	2	3	2	±	2	10	4				6	10	8	8	10
Glycocolle	3	±		2	2															
Alanine	3	±	4	2		1	3	3	4			6				2	6		2	2
Thréonine																2				
Tyrosine																				2
Valine	3		2	4		±	2	2	3							6	6	10	6	10
Leucine	3	±	3	4		8	4	3	8			2	2			6	2	10	2	5
Phénylalanine								3	2											
Diaminés	4	1	3	4												+	+	4	+	

(AD_IL). Les peptides (AD_II) et (AD_IK), bien que riches en acide glutamique et en acide aspartique, se situent sur le chromatogramme dans la zone des acides diaminomonocarboxyliques. En effet, dans leur constitution, on trouve une quantité relativement importante de lysine et d'arginine. Toutefois, leur comportement au cours du fractionnement ionophorétique permet de les considérer comme des polypeptides "fortement acides".

II) - ETUDE DES FRACTIONS POLYPEPTIDIQUES PRECIPITEES A UNE CONCENTRATION EGALE OU SUPERIEURE A 20 P. 100

Toutes les fractions P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 ont été soumises à un fractionnement général comportant :

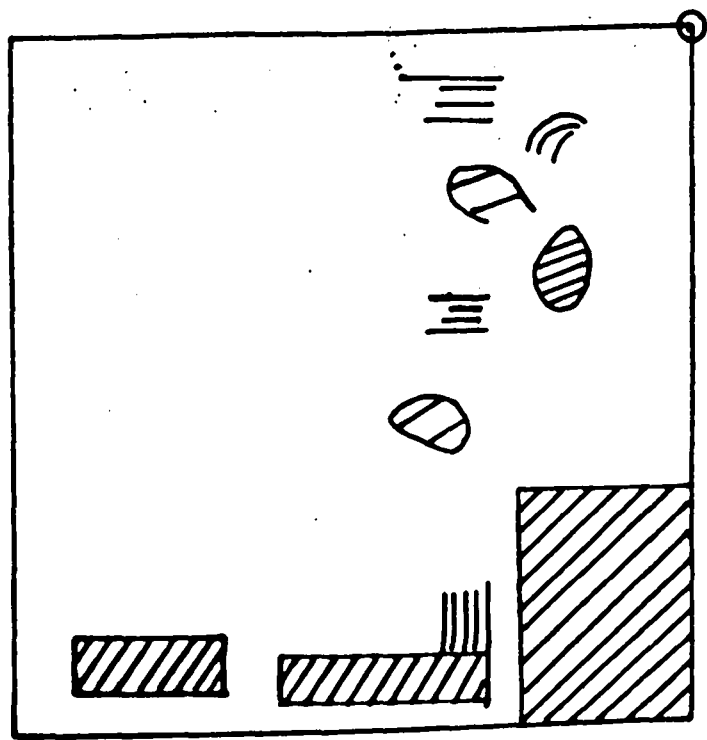
- a) un fractionnement ionophorétique
- b) une chromatographie sur résine à échange de cations (Pernutite 50)
- c) une chromatographie sur papier bidimensionnelle.

Les résultats que nous avons obtenus avec ce mode de simplification sont décevants. En effet, les chromatographies bidimensionnelles sont difficiles à interpréter. On observe, à quelques exceptions près, de grandes plages diffuses, mal délimitées, constituées par des mélanges de polypeptides. En utilisant la méthode à la carboxypeptidase de THOMPSON, on identifie généralement pour chaque plage ninhydrine positive 6 à 8 amino-acides différents.

En ce qui concerne la composition globale en amino-acides de toutes les fractions recueillies, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence des différences très marquées. Toutefois, les fractions P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 sont relativement plus riches en cystine que le groupe F 5.

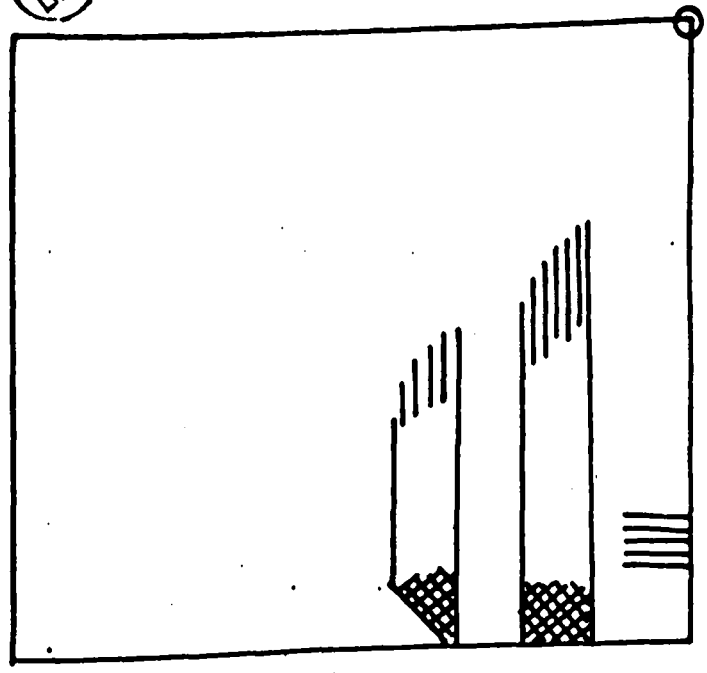
Un exemple, choisi parmi les plus favorables des résultats observés, est schématisé sur la figure 40.

Devant le peu de résultats positifs obtenus par ce premier mode de fractionnement, nous avons donc été obligés de reprendre entièrement la question. Nous avons conservé, en premier lieu, en essayant de l'améliorer pour en retirer le maximum



FRACTION *P4MA*

BU
LILLE



FRACTION *P4MZ*

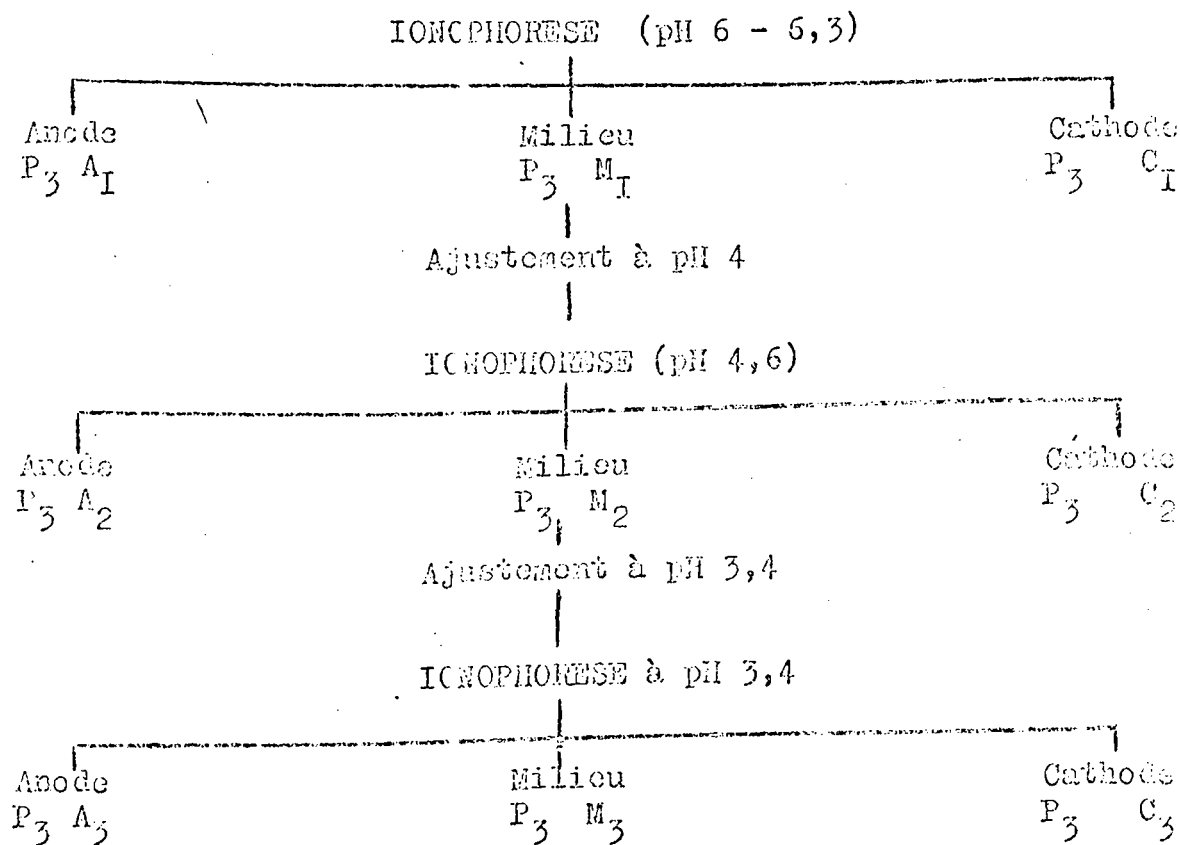
FIG. 40

Chromatogrammes schématiques

de profit, la méthode de séparation qui nous avait donné les moins mauvais résultats, le fractionnement ionophorétique. Nous avons essayé l'analyse par "déplacement sur colonnes de charbon". Enfin, il nous a semblé absolument indispensable de simplifier les polypeptides que nous voulions séparer par une hydrolyse chymotrypsique ou trypsique.

a) - FRACTIONNEMENT IONOPHORETIQUE. -

La Fraction P_2 obtenue en ajustant la concentration en acide trichloracétique à 10 p. 100, représente environ 15 p. 100 de l'azote de l'hydrolysate pepsique (voir Tableau XI). Elle est soumise à un triple fractionnement ionophorétique suivant les modalités schématisées ci-dessous :



Conditions expérimentales.-

1ère Ionophorèse : le pH du compartiment (C) est maintenu entre 6 et 6,3 (contrôle au pHmètre). Durée : 120 minutes. Au départ : 50 volts et 250 mA - après 90 minutes : 100 volts et 90 mA. Les trente dernières minutes sous 130 volts.

2ème Ionophorèse : Le pH du compartiment (C) est maintenu aux environs de 4,6. Durée : 100 minutes. Au départ : 130 volts et 200 mA - à la fin : 160 volts et 80 mA.

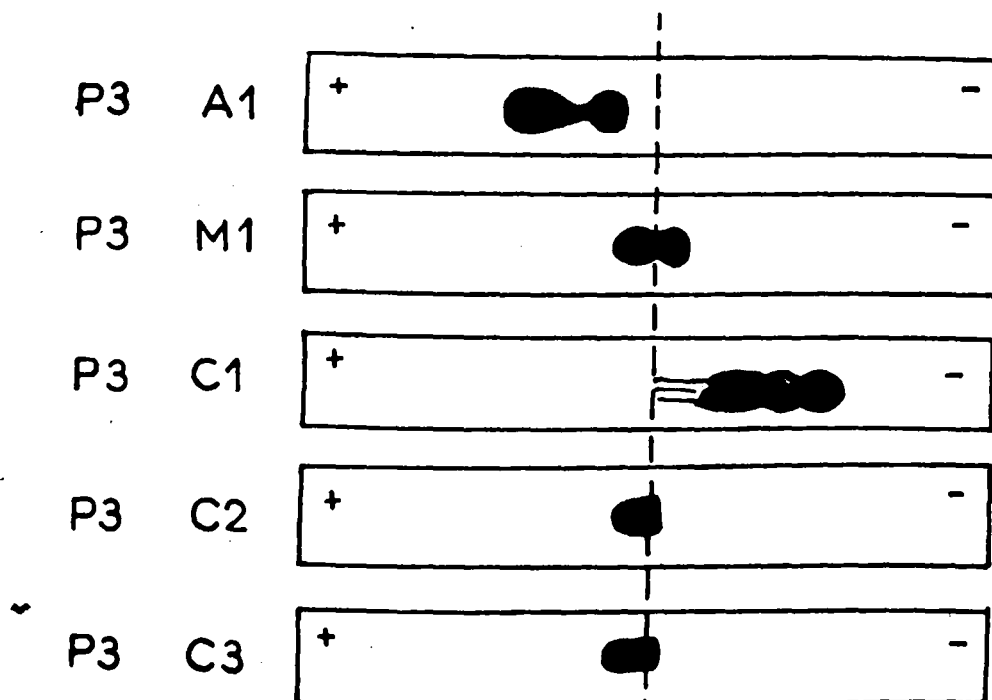
3ème Ionophorèse : Le pH du compartiment (C) est maintenu aux environs de 3,4. Le compartiment (B) est rempli avec de l'acide acétique à 1 p. 100 (en volumes) (pH 2,8). Durée : 100 minutes.

Chaque fraction, après évaporation, est étudiée en électrophorèse sur papier. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 41.

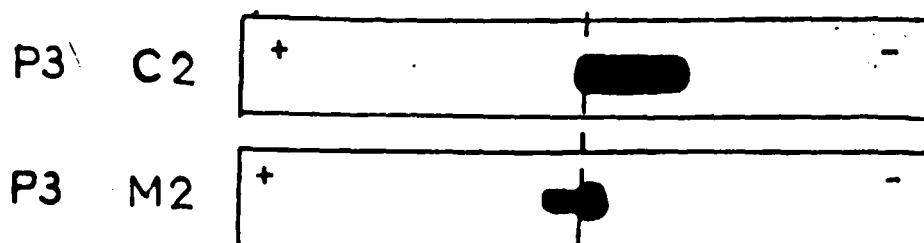
L'examen de ces diagrammes d'électrophorèse nous démontre facilement la validité du fractionnement que nous avons opéré. Chacune des 7 fractions ainsi obtenues est soumise à une "chromatographie" sur résine à échange de cations (Permutite 50) et fractionnée ainsi en deux sous-fractions : fraction retenue (A) et fraction non retenue (Z). Les 14 sous-fractions sont alors étudiées en chromatographie sur papier uni- et bidimensionnelle. L'ensemble des résultats de la chromatographie unidimensionnelle est rassemblée dans la figure 42.

La figure 43 nous montre deux exemples de chromatographies bidimensionnelle. L'une (fraction A) présentant une assez bonne résolution chromatographique ; l'autre (fraction Z) sans résolution.

① Electrophorèse à pH 7 :



② Electrophorèse à pH 4,5 :



③ Electrophorèse à pH 2,9 :

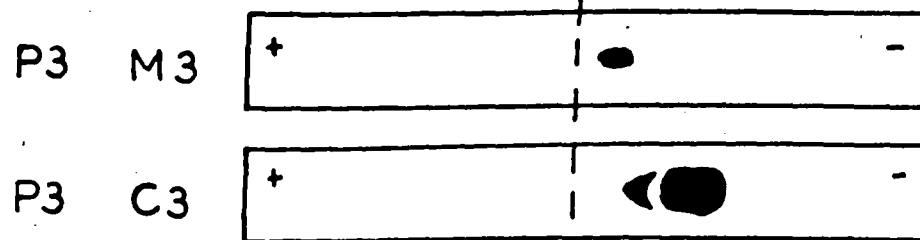


FIG. 41

En conclusion, ce type de fractionnement est donc très satisfaisant. Toutes les fractions (A) retenues sur Permutite peuvent être facilement étudiées et séparées par des chromatographies de partage. Cependant pour l'ensemble des fractions (Z) non retenues sur Permutite la résolution réalisée par la chromatographie de partage est mauvaise et leur étude nécessite obligatoirement une simplification des substrats polypeptidiques au moyen d'une hydrolyse chymotrypsique ou trypsique ou un fractionnement par chromatographie sur colonne de charbon suivant le principe de l'analyse par développement par déplacement.

b) - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE OU TRYPSIQUE D'UNE FRACTION COMPLEXE.-

Les fractions (P_2) et (P_3) (voir Tableau XI) sont d'abord soumises à un fractionnement ionophorétique (pH 4,8). Les fractions recueillies dans le compartiment (C) (P_2M et P_3M) sont subdivisées en deux sous-fractions par "chromatographies" sur une résine à échange de cations (P_2MA et P_3MA retenues sur la colonne et éluées par l'ammoniaque diluée, - P_2MZ et P_3MZ , non retenues).

La chromatographie bidimensionnelle de ces deux dernières fractions révèle leur grande complexité puisqu'on a observé principalement deux grandes plages diffuses ninhydrine positive (voir figure 44).

La fraction P_3MZ est soumise à une hydrolyse trypsique à pH 8,2 (ajustement au sesquicarbonate d'ammonium) pendant 18 heures à 37°C, la fraction P_2MZ à une hydrolyse chymotrypsique à pH 8,25 pendant 18 heures à 37°C.

Après évaporation, les hydrolysats sont étudiés en chromatographie unidimensionnelle (figure 45). La complexité des chromatogrammes obtenus donne une idée de la simplification struc-

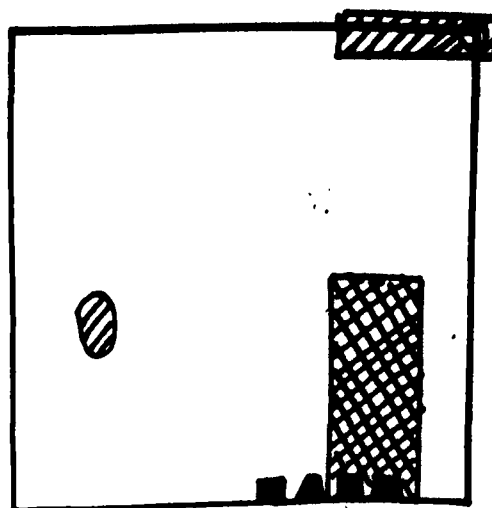


FIG. 44

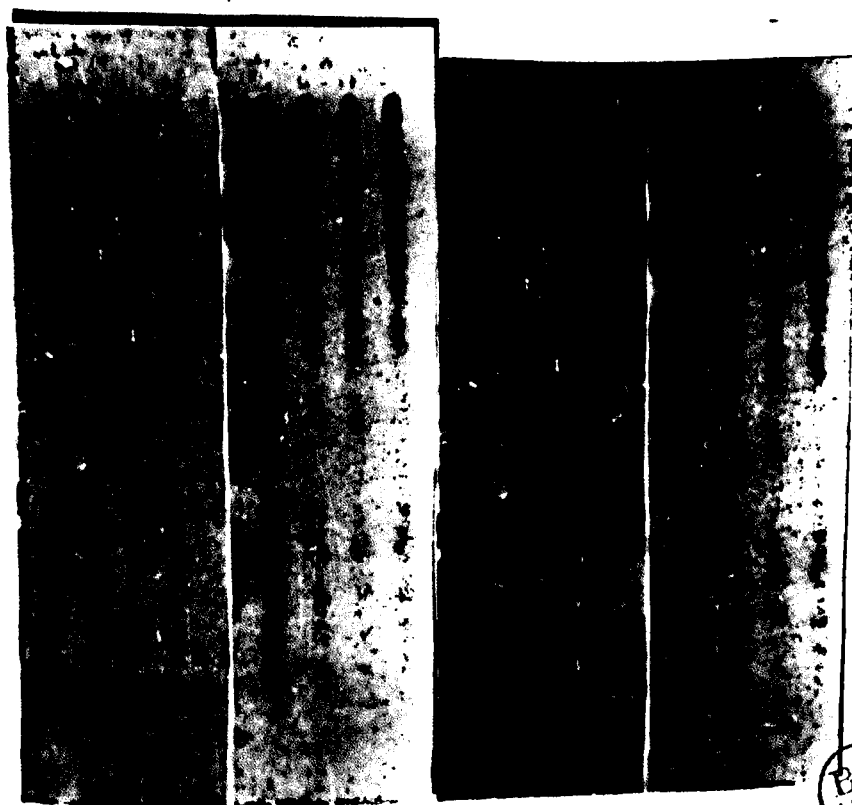


FIG. 45

P2 M Z P3 M Z
chymotrypsine trypsin
chromatographie
à doses croissantes
(1/4, 1/2, 1, 2 mg)

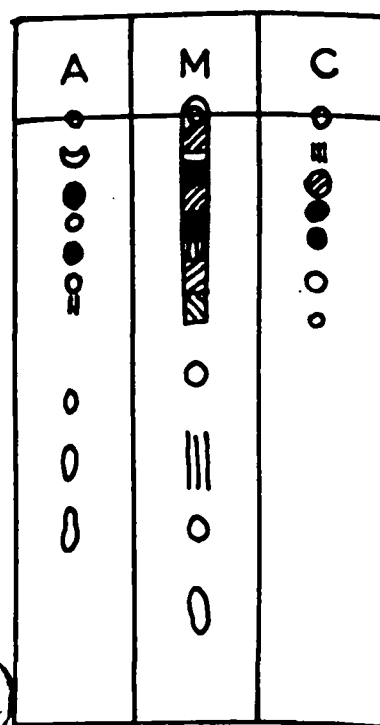


FIG. 46

Après IONO (pH 7.0),
de l'hydrolysat
trypsique (P3M Z),
contrôle chromatographique

120
turale des polypeptides qui s'est produite au cours de l'hydrolyse enzymatique. Chaque hydrolysats est alors soumis à un fractionnement ionophorétique (pH 6-7) dont le pouvoir résolutif est illustré par le chromatogramme unidimensionnel de la figure 46.

c) - ANALYSE PAR DEVELOPPEMENT PAR DEPLACEMENT.-

La fraction P_3 est soumise à un fractionnement ionophorétique (pH 4,8). Le contenu du compartiment cathodique (P_3C) est subdivisé en 2 sous-fractions par "chromatographie" sur résine à échange de cations (P_3CA et P_3CZ). La chromatographie bidimensionnelle de la fraction retenue sur la résine à échange de cations, montre l'existence de cinq plages diffuses (figure 47). Ce mélange de polypeptides est séparé par une analyse par développement par déplacement sur colonne de charbon.

Conditions expérimentales.-

- Colonne à "sections" : 1ère section : hauteur 17 cm,
diamètre 8 mm
2ème section : hauteur 6 cm,
diamètre 2 mm.
- Adsorbant : 1 partie d'Activit XL 50 et 3 parties d'Hyflo-Super-Cel.
Déplacement effectué par une solution à 1 p. 100 (en volumes) de CEQUARTYL dans HCl N/10.
Vitesse de passage : une goutte toutes les 45 secondes. 100 fractions de 2 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur automatique.

L'étude de toutes ces fractions est effectuée par chromatographie unidimensionnelle dans le système butanol/acide acétique. La figure 48 rassemble quelques aspects caractéristi-

FIG 47 Fraction P3C-a.

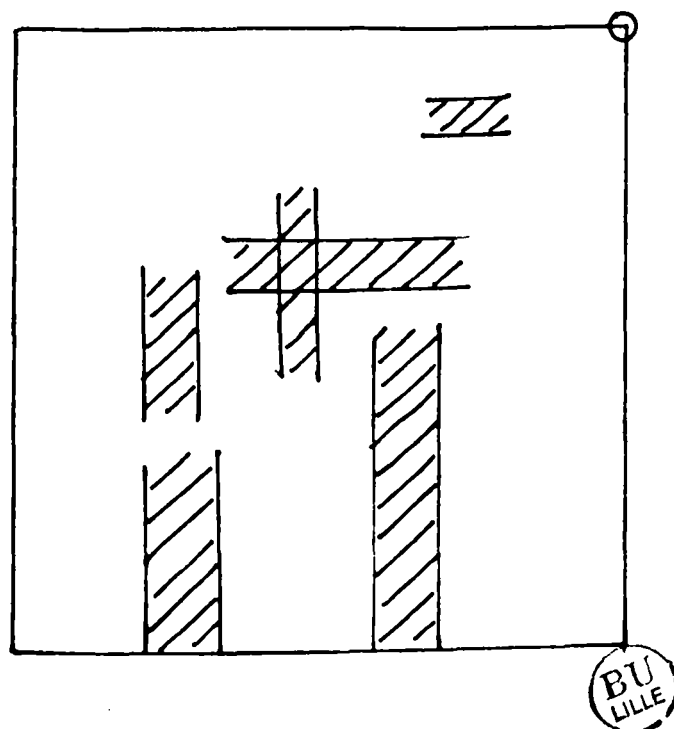
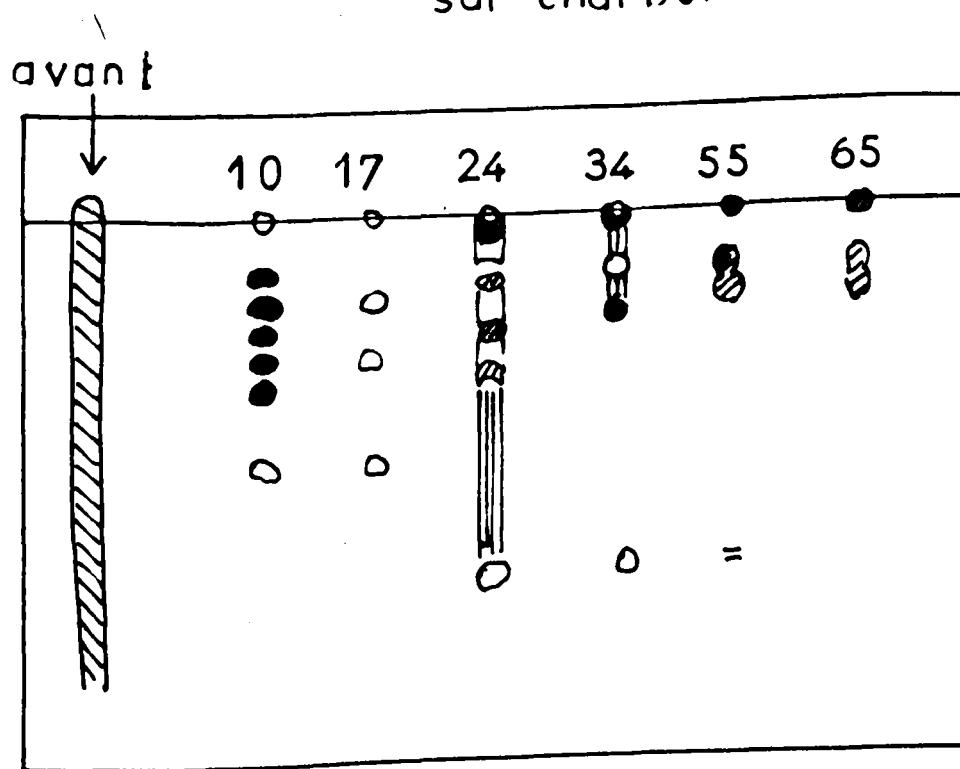


FIG. 48 - Analyse par déplacement
sur charbon de P3Ca.



10 = n° des tubes du collecteur

ques des chromatogrammes obtenus.

L'examen de cette figure montre les possibilités réelles de cette méthode. On n'obtient pas directement un fractionnement du mélange, mais une simplification suffisante pour que l'on puisse ensuite effectuer avec efficacité des séparations par chromatographie de partage sur des groupes de taches rassemblés.

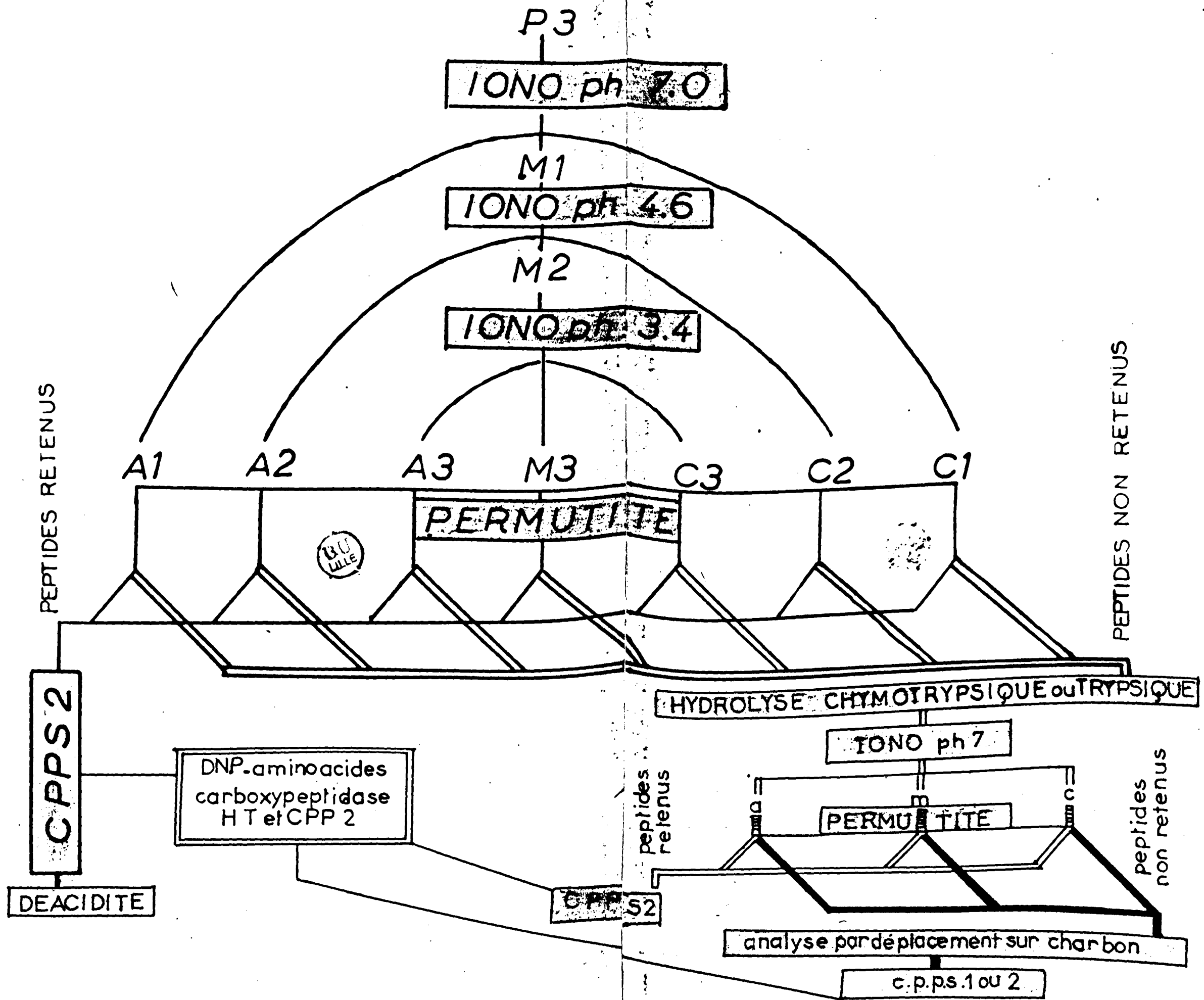
En conclusion, les expériences qui sont rapportées dans ce paragraphe ont été choisies parmi celles qui présentaient le plus d'efficacité dans la séparation d'un mélange polypeptidique. Après cette expérimentation, nous sommes donc en mesure de proposer un plan-type de fractionnement d'un mélange polypeptidique très complexe, qui est schématisé dans le Tableau XXII.

TABLEAU XXII

PLAN GENERAL DE FRACTIONNEMENT DES POLYPEPTIDES
"COMPLEXES"

Les abréviations suivantes ont été employées :

- HT : hydrolyse totale
- IONO pH 7.0 : fractionnement ionophorétique avec maintien du compartiment médian (C) à pH 7.0
- A, C, M \ : compartiment anodique, cathodique et médian de la cellule à ionophorèse
- PERMUTITE : "chromatographie" sur résines à échange d'ions
- DEACIDITE
- C.P.P.I. ou 2 : chromatographie de partage sur papier uni-
(1) ou bidimensionnelle (2)
- C.P.P.S. I : chromatographie de partage séparative sur
ou 2 papier
- P₃ : fraction polypeptidique d'un hydrolysat pepti-
que précipitée à la concentration de 10 p. 100
en acide trichloracétique.



CONCLUSIONS

Les conclusions générales de ce travail peuvent se résumer succinctement de la façon suivante :

a) : Pour 50 p. 100 de l'azote polypeptidique d'un hydrolysat pepsique, nous avons mis au point

UN PLAN DE FRACTIONNEMENT PAR PROCÉDÉ PARFAIT

et réalisé

UN MÉTHODE SIMPLE DE LA CÉLÉBRATION DE LA TITR-ACIDES
DES DIFFÉRENTES FRACTIONS INDIVIDUELLES SÉPARÉES

b) : Pour 30 p. 100 de l'azote polypeptidique, nous avons établi

UN PLAN DE FRACTIONNEMENT PAR PROCÉDÉ PARFAIT

que nous sommes en train de perfectionner.

c) : Pour les derniers 20 p. 100 d'azote polypeptidique, il nous semble indispensable, avant tout essai de fractionnement, de procéder à une simplification du substrat par une nouvelle hydrolyse enzymatique.

BIBLIOGRAPHIE

- 126 -

Les chiffres entre crochets indiquent l'ordre d'apparition dans le texte.

- ACERB R., JUTISZ E. et ERCHAGOT., Biochim. Biophys. Acta, 8, 442 (1952) [41, 69, 78].
- ALBANESE A.A., J. Biol. Chem., 134, 467 (1940) [167].
- ANDERSEN C.D., J. Biol. Chem., 196, 201 (1952) [21bis].
- BATE-SMITH R.C. et WESTALL R.F., Biochim. Biophys. Acta, 4, 427 (1950) [61].
- BELL P.M., Am. N.Y. Acad. Sci., 51, 397 (1949) [110].
- BISERTE G., Biochim. Biophys. Acta, 4, 416, (1950) [160].
- BISERTE G. et BOULANGER P., Publ. Soc. Chim. Biol., 32, 601 (1950) [46, 92, 95].
- BISERTE G. et OSTREUX R., Publ. Soc. Chim. Biol., 33, 50 (1951) [6, 20, 81].
- BISERTE G. et FIGACHE P., Publ. Soc. Chim. Biol., 33, 1379 (1951) [13].
- BLACKBURN S., 287^e Réunion de la "Biochemical Society" [12].
- BLACKBURN S. et LOWMYER A.G., Biochem. J., 48, 126 (1951) [79].
- DOORSOOK H., DEASY C.L., HAMPTON-SMITH A.J., KEICHELNY G. et LOHRY P.M., J. Biol. Chem., 174, 104 (1948) - 179, 705 (1949) [103].
- BOULANGER P. et BISERTE G., Exp. Ann. Biochimie médicale (Masson, Paris) Tome XI, 53 (1950) [38].
- BOULANGER P. et BISERTE G., C.R. Acad. Sci., 233, 1498 (1951) [124].
- BOULANGER P., BISERTE G., et COURTOT F., Publ. Soc. Chim. Biol., (sans presse) [125].
- BUTLER J.A.V. et STEPHEN J.M.L., Nature, 160, 469 (1947) - Biochem. J., 42, X, (1948) [56].
- BUTLER J.A.V., BODES E.C., PHILLIPS D.M.P. et STEPHEN J.M.L., Biochem. J., 42, 122 (1948) [23].

.....

-
- CAMPBELL P.H., WORK T.S., MELLANBY H., *Biochem. J.*, **48**, 106 (1951) [113].
- CANNAN R.K., *J. Biol. Chem.*, **152**, 401 (1944) [133].
- CHARLWOOD P.A., *Biochem. J.*, **51**, 113 (1952) [4].
- CLAESSENS S., *Archiv. Kon. Minera. o. Geol.*, **23 A**, n° 1, (1946) [145].
- CLAESSENS S., *Arch. Kon. Minera. o. Geol.*, **24 A**, n° 16 (1947) [122, 143].
- CHENG D.L., *Analyt. Chem.*, **22**, 48 (1950) [39].
- COHEN E.J., *Trans. Coll. Phys. Philad.*, **10**, n° 3, 149 (1942) [1].
- CONDON R. et GORDON A.H., *Biochem. J.*, **46**, 8 (1950) [87].
- CONDON R., GORDON A.H. et MARTIN A.J.P., *Biochem. J.*, **38**, 204 (1944) [31, 112] - *Biochem. J.*, **40**, 33 (1946) [53] - *Biochem. J.*, **42**, 443 (1948) [50, 52, 54, 56, 58, 71] - *Biochem. J.*, **42**, 443 (1948) [55].
- CONDON R., GORDON A.H., MARTIN A.J.P. et SYDGE R.L.M., *Biochem. J.*, **41**, 596 (1947) [64, 85].
- COOK A.H. et LEVY A.L., *J. Chem. Soc.*, **646** (1950) [60].
- CRAIG L.C., *J. Biol. Chem.*, **135**, 519 (1944) - *Anal. Chem.*, **22**, 1346 (1950) [170].
- CREETH J.M., *Biochem. J.*, **51**, 10 (1952) [3].
- CREMER D. et TISELIUS A., *Biochem. Z.*, **320**, 273 (1950) [90, 158].
- CRONINER M.H., KEMP C.B., HARRIS W. et WILSBALL R.G., *Nature*, **167**, 301 (1951) [126].
- CURRIE B.T. et HALL W.B., *J. Biol. Chem.*, **123**, 29 (1951) [21, 171].
- DAVIES C.W., *Biochem. J.*, **42**, 33 (1949) [127].
- DELFYER C.A., STONE D. et BRUTON J.S., *J. Biol. Chem.*, **161**, 719 (1951) [2].
- DEMP C.E., *Biochem. J.*, **43**, 159 (1948) [72].
- DEROUILLÉ P., *Bull. Soc. Chim. France*, **5-6**, D 251 (1949) [26].
- DEROUILLÉ P. et CASAL A., *Mémoires/ Biophys. Acta*, **2**, 43 (1948) [9].
-

-
- DESEVELLE P. et ROVERY M., Biochem. Biophys. Acta, 3, 450 (1952) [174].
- DESEVELLE P., ROVERY M. et ROUJOUR G., Biochem. Biophys. Acta, 5, 116 (1950) 15, 22.
- DESEVELLE P., ROVERY M. et FAIRE C., C.R. Acad. Sci., 233, 987 (1951) [7].
- DIXON H.B.F., MOORE S., STACK-DUNN H.P. et YOUNG F.G., Nature, 163, 1044 (1951) [141bis].
- DRABE B., Nature, 160, 602 (1947) [119].
- DURNUM E.L., J. Amer. Chem. Soc., 72, 2943 (1950) [159].
- DURNUM E.L., J. Colloid Sci., 6, 274 (1951) 162, 164, [165].
- EARENSGUARD G., DAID L., SALUSTE E. et STJERNHOLM R., J. Biol. Chem., 189, 23 (1951) [130].
- EDMAN P., Arkiv. Kem. Mineral. Geol., 22 A, 1, (1945) [43].
- FELS T.G., TISELIUS A., Arkiv. f. Kem., Ed 3, n° 39, 369 (1951) [107].
- FRANKFEL-CONRAT M. et FRANKFEL-CONRAT J., Acta Chem. Scand., 5, 1409 (1951) [102].
- FROMAGEOT C., JUTISZ L., MEYER D. et FERRASSE L., Biochim. Biophys. Acta, 6, 283 (1950) [96bis].
- FROTON J.S. et BRIGLIANI J.B.C., J. Biol. Chem., 127, 627 (1939) [17].
- GARDILL S., GORDON R.H. et AGREST S., Acta Chem. Scand., 4, 907 (1950) [155].
- GILBERT G.A. et SWALLOW A.J., Biochem. J., 47, 502 (1950) [137].
- GORDON A.H., KEIL D. et SHIMURA K., Nature, 164, 498 (1949) [155].
- HAGDAHL L., Acta Chem. Scand., 2, 574 (1948) [143].
- HALL D.A. et TISELIUS A., Acta Chem. Scand., 5, 854 (1951) [146].
- HANES C.S. et ISHERWOOD F.A., Nature, 164, 1107 (1949) [37].
-

.....

- 129 -

- HANES C.S., HIRS F.J.R., ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 51, 25 (1952) [44, 70].
HARRINGTON C.R. et PITT-RIVERS R.V., Nature, 159, 301 (1944) [18].
HAUGAARD D. et KRONER L.M., J. Amer. Chem. Soc., 70, 2135 (1948) [166].
HEYNS K. et ALBERS G., Hoppe Seyler's Z. f. Phys. Chem., 287, 8 (1951) [62].
HIRS C.H.W., MORRE S. et STEIN W.H., J. Biol. Chem., 195, 669 (1952) [131].
J. Amer. Chem. Soc., 73, 1893 (1951) [13 140].

INGRAM V.M., Nature, 166, 1038 (1950) [103].

JONES T.S.G., Discussion Faraday Soc., 7, 235 (1949) [48].

KARIYONE T., HASHIMOTO Y. et KIMURA M., Nature, 168, 511 (1951) [143]

KNIGHT C.A., J. Biol. Chem., 190, 753 (1951) 53, 55, [57]

KRITCHEVSKY T.H. et TISELIUS A., Science, 114, 299 (1951) [33]

LECHIS J. et LEVY A.L., Intl. Soc. Chin. Biol., 33, 779 (1951) [101]

LESTER-SMITH E.L., Nature, 169, 60 (1952) [114]

LI C.H. et PEDERSEN K.O., Arch. f. Kem., Bd 1, n° 61, 533 (1949) [106]

LI C., et TISELIUS A., PEDERSEN K., MAGGALL L. et CARSTENSEN H., J. Biochem. Chem., 190, 317 (1951) [105]

LI C.H., AGE L. et PARKOFF J., J. Amer. Chem. Soc., 74, 1923 (1952) [150, 172].

McC DONALD H.J., URBIN H.C., WILLIAMSON H.B., J. Colloid. Sci., 6, 236 (1951) [163].

MARTIN A.J.P., Fibrous Proteins (The Society of Dyers and Colourists BRADFORD) p. 1 (1946) [88].

MARTIN A.J.P., Ann. N.Y. Acad. Sci., 49, 249 (1948) [59].

.....

.....
MARTIN A.J.P., Biochemical Society Symposia (CAMBRIDGE), 3, 4 (1949) [34, 109].

MARTIN A.J.P. et SYNGE R.L.M., Biochem. J., 35, 1353 (1941) [29, 35, 36].

MARTIN A.J.P. et SYNGE R.L.M., Adv. in Protein Chem., 2, 31 (1945) [151].

MARTIN A.J.P. et PORTER R.R., Biochem. J., 49, 215 (1951) [111].

MOULIER R. et FROMAGNOT C., Biochim. Biophys. Acta, 5, 224 (1950) [45, 66].

MOULIER R., et JUTICZ M., Publ. Soc. Chim. Biol., 32, 228 (1950) [65].

MOULIER R. et PEFASSE L., C.R. Acad. Sci., 230, 1176 (1950) [80].

ROCHE S. et STEIN W.M., J. Biol. Chem., 192, 663 (1951) [132].

MOORE-GILLESPIE I., Biochem. Biophys. Acta, 2, 389 (1948) [16, 24].

PALEUS S. et HILANDS J.B., Acta Chem. Scand., 4, 1024 (1950) [141].

PARDEE A.B., J. Biol. Chem., 190, 757 (1951) [58, 99].

PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 42, 238 (1948) [40] - 44, 521 (1949) - 45, 459 (1949) [117, 123] - Nature, 169, 496 (1952) [139].

PARTRIDGE S.M. et BRILLEY R., Biochem. J., 48, 313, (1951) - 42, 153 (1951) [117, 123, 128].

PARTRIDGE S.M. et DAVIS H.F., Nature 165, 62 (1950) [11].

PARTRIDGE S.M. et SWAIN T., Nature, 166, 272 (1950) [32].

PARTRIDGE S.M. et WESTALL R.G., Biochem. J., 44, 418 (1949) [117, 123].

PARTRIDGE S.M., BRILLEY R.C. et PERPER K.W., Biochem. J., 45, 334 (1950) [117, 123].

PARTRIDGE S.M., WESTALL R.G. et BRIDALL J.R., Nature, 160, 374 (1947) [120].

PHILLIPS D.M.P., Nature, 161, 53 (1948) 49 - Biochem. Biophys. Acta 3, 341 (1949) [25, 91].

POWELL J. et FLODIN P., Nature 168, 202 (1951) [93].

RICHARDSON R.W., Nature, 164, 916 (1949) [138].

RITCHIE R.V. et SMITH P.T.G., Nature, 162, 922 (1948) [91].

.....

SANGER F., Biochem. J., 39, 505 (1945) [60, 77] - 42, 261 (1946) [84]
45, 563 (1949) [60, 77]

SANGER F. et THOMPSON E.D.P., 309^{ème} Réunion de la "Biochemical Society"
 [104bis]

SANGER F. et TUPPY H., Biochem. J., 49, 463 (1951) [42, 47, 51, 63, 73
 75, 76, 89, 96, 97, 134, 169]

SANGER F. et TUPPY H., Biochem. J., 49, 481 (1951) [19, 27, 92, 104]

SCATCHARD G., BATCHELDER A.C. et BROWN A., J. Amer. Chem. Soc., 68,
 2320 (1946) [2]

STEIN et MOORE S., Cold Spring Harbor Symposia XIV, 179 (1950) [5, 129]

STEIN W.H. et MOORE., J. Biochem. Chem., 190, 103 (1951) [67]

SVENSSON A., Adv. in Protein Chem., 4, 251 (1948) [152]

SYNGE R.L.M., Biochem. J., 39, 351 (1946) [10, 83] - 49, 642 (1951)
 [168]

THOMPSON A.R., Nature, 169, 495 (1952) [98]

TISELIUS A., Ark. Min. o. Geol., 16 A, n° 18, (1943) [121, 142]

TISELIUS A. et CLAESSEN S., Ark. Kem. Min. o. Geol., 15, n° 18 (1942)
 [147]

TISELIUS A. et ERIKSSON-QUEENSL I.B., Biochem. J., 33, 1752 (1939) [14]

TISELIUS A. et HAGDAHL L., Acta Chem. Scand., 4, 394, (1950) [115, 143]

TURBA F. et EHMKE H.J., Naturwiss., 37, 93 (1950) [161]

WIELAND Th., Angew. Chem., 50, 313 (1948) - Naturwiss 35, 29 (1948) [157]

WINTERS J.C. et KUNIN R., Ind. Eng. Chem., 41, 3, 460 (1949) [136]

2^e THESE

**2^e Thèse : Propositions données par la
Faculté**

2^e THESE

**2^e Thèse : Propositions données par la
Faculté**