

N° d'ordre : 93

113874

50376

1958

1

THÈSES

présentées à la FACULTÉ DE SCIENCES DE LILLE

par

MICHEL DAUTREVAUX

pour obtenir

le **GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES**

[Sciences mathématiques]

PREMIÈRE THÈSE

Etude des Polymyxines

Détermination de la structure de la Polymyxine B

SECONDE THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 4 Janvier 1958 devant la Commission d'Examen

Monsieur Jean GERMAIN, président
Monsieur DEFRETIN,
Messieurs BOULANGER, GLACET & MONTREUIL, examinateurs

SCD LILLE 1



D 030 205582 4

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

- DOYEN : M. LEFEBVRE, Professeur de Chimie Appliquée et
Chimie de la Houille.
- ASSESEUR : M. ROUELLE, Professeur de Physique et Electricité
Industrielles.
- DOYENS HONORAIRES : M.M. CHATELET, PRUVOST.
- PROFESSEURS HONORAIRES : M.M. BEGHIN, CAU, CHAPELLON, CHAUDRON, CORDONNIER,
DECARRIERE, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, LAMOTTE,
LELONG,
Mme LELONG,
M.M. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL,
PAUTHENIER, WIELMANN, ZAMANSKY.
- PROFESSEURS : M.M. ARNOULT, Radioélectricité et Electronique
Industrielles.
BONTE, Géologie appliquée.
BROCHARD, Physique.
CORSIN, Paléobotanique.
DECUYPER, Mathématiques Générales.
DEHEUVELS, Analyse Supérieure et Calcul des
Probabilités.
DEHORS, Physique Industrielle.
Mlle DELWAULLE, Chimie Minérale.
M.M. DESCOMBES, Calcul Différentiel et Intégral.
DUPARQUE, Géologie et Minéralogie.

(Professeurs)

M.M. Jean GERMAIN, Chimie Générale et Chimie
Organique.

Paul GERMAIN, Mécanique rationnelle et Mécanique
Expérimentale.

HELM de BALSAC, Zoologie.

HOCQUETTE, Botanique Générale et Appliquée.

KAMPE DE FERIET, Mécanique des Fluides.

KOURGANOFF, Astronomie.

LEBEGUE, Chimie Agricole et Botanique P.C.B.

PEREZ, Physique P.C.B.

ROIG, Physique Générale.

ROUBINE, Physique.

SAVARD, Chimie Générale.

WATERLOT, Géologie houillère.

MAITRES DE CONFERENCES :M.M. DEFRETIN, Zoologie.

DELATRE, Géologie.

FRENKEL, Mathématiques.

GLACET, Chimie.

HEUBEL, Chimie P.C.B.

LEBRUN, Radioélectricité et Electronique.

MANDELBROT, Calcul des Probabilités.

MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des Fluides.

MONTREUIL, Chimie Bidogique.

Louis MICHEL, Physique Théorique.

PARREAU, M.P.C.

POITOU, Méthodes Mathématiques de la Physique.

TRIDOT, Chimie Appliquée.

SECRETAIRE :

Mme BOUCHEZ.

—ooOoo—

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille ; que notre Maître, le Professeur Paul BOULANGER, veuille trouver ici l'expression de notre très vive gratitude et de notre respectueux attachement. La bienveillance qu'il nous a constamment témoignée, l'intérêt qu'il a toujours porté à notre travail, ont été pour nous le meilleur encouragement.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Professeur Agrégé Gérard BISERTE, dont les conseils éclairés nous ont permis d'amener ce travail à terme ; ses vastes connaissances dans la chimie des protéines nous ont été d'un précieux secours. La joie de la découverte et l'enthousiasme scientifique qu'il a su nous communiquer, la sympathie qu'il nous témoigne constamment, sont pour nous autant de gages d'amitié.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur Jean GERMAIN, qui nous fait l'honneur de présider le jury de notre thèse ; déjà, au cours de nos études à la Faculté des Sciences, nous avons apprécié la manière dont il nous enseignait et faisait aimer la chimie. Son très juste esprit critique nous a utilement guidé dans l'ultime mise au point de notre thèse.

Nous remercions aussi Messieurs les Professeurs GLACET et MONTREUIL, qui ont accepté avec une grande obligeance de juger notre travail.

Enfin, nous tenons à associer à notre reconnaissance Monsieur le Professeur Agrégé Roger OSTEUX, qui nous a préparé les extraits de rein de mouton avec lesquels nous avons pu étudier les d-amino-acides de la Polymyxine B.

Que nos camarades de la Salle 31, R. PLAQUET, R. HAVÉZ, P. PAYSANT et P. SAUTIERE, veuillent bien trouver ici l'expression de nos sentiments amicaux. Nous y associons notre ami, P. FIGACHE, et tous nos camarades du laboratoire de Chimie Biologique, J. LATURAZE, J. HOLLEMAN et R. GEORGE.

Nous remercions également Mesdemoiselles T. SCHOONAERT et T. POTIER de leur collaboration technique aussi dévouée qu'agréable.

Nous remercions, enfin, les Laboratoires CLIN-COMAR, qui nous ont procuré avec une grande amabilité les échantillons de Polymyxine B, préparés par les Laboratoires PFIZER, le Docteur BROWNLEE (Wellcome Research Laboratories), qui nous a aimablement fait parvenir des spécimens des différentes polymyxines et, enfin, les laboratoires R. BELLON et SMIT de Turin, qui nous ont gracieusement fourni des échantillons de Colimycine.

—ooOoo—

I N T R O D U C T I O N

L'intérêt considérable présenté par les antibiotiques polypeptidiques d'origine bactérienne remonte à la découverte de DUBOS (1) en 1939, au Rockefeller Institute. Cet auteur a, en effet, constaté l'activité bactériostatique des cultures de Bacillus brevis, même après autolyse de celles-ci. La substance responsable de cette activité a pu être isolée et on a établi sa nature polypeptidique : elle a été appelée Tyrothricine. Dix-huit ans ont passé depuis cette première publication. Durant ces années, les méthodes microbiologiques et les méthodes chimiques d'étude des structures peptidiques ont été considérablement améliorées. Elles ont permis à la fois la purification, le fractionnement des peptides et l'étude de leur structure ; en même temps, on a assisté à la découverte d'un grand nombre de substances bactériostatiques nouvelles.

La structure de quelques-uns des antibiotiques polypeptidiques a pu être établie avec précision ; notre travail sur la Polymyxine B est une modeste contribution à cette étude chimique.

Après avoir rappelé les différents stades de la découverte et de l'étude des polymyxines, nous exposerons brièvement les différentes modalités de la détermination des séquences peptidiques. Enfin, nous rapporterons les résultats que nous avons pu obtenir dans l'étude de la polymyxine B.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

Les polypeptides bactériens à activité antibiotique, classés sous le nom de "polymyxines", furent découverts indépendamment et presque simultanément, en 1947, par trois laboratoires différents :

BENEDICT et LANGLYKKE (2) publiaient, le 16 Mai 1947, à la réunion annuelle de la "Society of American Bacteriologists", un article intitulé "Antibiotic activity of Bacillus polymyxa". Ces auteurs constataient l'activité antibactérienne de colonies de Bacillus polymyxa et établissaient que la substance antibactérienne était hydrosoluble et produite à l'état libre par les cellules de ce bacille ; le milieu de culture était, en effet, actif à la dilution de 1/1000 contre Brucella bronchisepta.

En Juillet 1947, paraissait dans le Bulletin du John Hopkins Hospital, un article intitulé : "Polymyxin : A new chemotherapeutic agent", et signé par STANSLY, SHEPHERD et WHITE (3). La polymyxine isolée par ces auteurs, était caractérisée par sa spécificité d'action vis-à-vis des germes "Gram négatif". L'article insistait, d'autre part, sur la difficulté d'obtention de mutants résistants, à partir de souches sensibles à la polymyxine.

Enfin, le 23 Août de la même année, on trouvait dans "Nature", une brève communication de AINSWORTH, BROWN et BROWNLEE (4), intitulée "Aerosporin, an antibiotic produced by Bacillus aerosporus". Il apparaissait immédiatement que l'aérosporine et la polymyxine étaient très voisines l'une de l'autre, sinon identiques : en effet,

les organismes qui produisent ces deux antibiotiques sont étroitement apparentés (*) et, d'autre part, les propriétés chimiques et bactériologiques de l'aérosporine sont semblables à celles de la polymyxine.

L'activité antibiotique de ces nouvelles substances contre les bactéries Gram négatif, -notamment contre Haemophilus pertussis et Eberthella typhosa-, était particulièrement intéressante. Malheureusement, l'utilisation thérapeutique de ces substances était limitée par leur toxicité. BROWNLEE et BUSHBY (6), les premiers, ont insisté sur les accidents rénaux provoqués par l'administration de la polymyxine et de l'aérosporine au Rat et au Chien. Les différents chercheurs s'efforcèrent donc d'éliminer cette toxicité, soit en poussant davantage la purification des antibiotiques, soit en recherchant de nouvelles souches productrices de substances atoxiques.

Cette recherche de souches nouvelles amena la découverte de plusieurs autres polymyxines, dont l'étude chimique et microbiologique a permis de démontrer l'individualité ainsi que les liens d'étroite parenté.

On décrit donc, actuellement, sous les dénominations suivantes, les divers antibiotiques produits par diverses souches de B. polymyxa :

- Polymyxine A ou Aérosporine de AINSWORTH
- Polymyxine B de BROWNLEE (souche CN I4I9)
- Polymyxine C de BROWNLEE (souche CN 2I36)
- Polymyxine D de BENEDICT et de STANSLY (souche II4 J)
- Polymyxine E de BROWNLEE (souche EA IO8)

Par la suite, cette liste a été complétée par d'autres substances isolées des milieux de culture de souches différentes. Des analogies de composition chimique ont permis de faire rentrer dans la série des polymyxines, la Circuline, isolée par

(*) B. aerosporus est considéré par BERGLEY (5) comme un synonyme peu usité de Bacillus polymyxa.

MURRAY (1948) (7), des milieux de culture de Bacillus circulans, et la Polypeptine, extraite par Mac LEOD (1948) (8), des milieux de culture de Bacillus Krzenieniewski mutant de Bacillus circulans. Ces deux substances sont caractérisées, comme les polymyxines A, B, C, D et E, par leur haute teneur en acide α, γ -diaminobutyrique (9). Enfin, les études que nous avons faites sur la composition de la Colimycine ou Colistin, antibiotique isolé par YASUO KOYAMA, en 1950 (10), à partir de Bacillus Colistinus, nous permettent de ranger cet antibiotique dans la série des polymyxines.

—ooOoo—

CHAPITRE II

PRODUCTION, ISOLEMENT et PURIFICATION des POLYMYXINES

Bacillus polymyxa est une espèce tellurique relativement commune ; PORTER et coll., (11) ont isolé du sol 65 souches physiologiquement différentes. Une souche ne produit, en principe, qu'une Polymyxine (JONES) (12).

Ces souches sont titrées sur des plaques d'agar, vis-à-vis de diverses bactéries, pathogènes ou non, par la méthode de WAKSMAN (13). Le filtrat des bouillons de culture peut aussi être titré in vivo en estimant son action contre le choléra des poules, provoqué par Pasteurella multocida.

A - PRODUCTION ET ISOLEMENT

Le milieu de culture de B. polymyxa est constitué par une solution à 3 p. 100 de "Corn steep liquor" (*) et de 1 à 3 p.100 de glucose. Le pH, après stérilisation, est de 6,5. Après ensemencement, la fermentation est conduite à 26-28°C, sous agitation et aération constante pendant une soixantaine d'heures.

Le bouillon de culture est alors soumis à une extraction fractionnée par l'isopropanol, en présence de sulfate d'ammonium. Les extraits isopropanoliques sont évaporés sous vide et le sirop obtenu, repris par le méthanol, est passé sur une colonne d'alumine qui retient les substances peptidiques ; l'élution de la colonne

(*) Au cours de la préparation industrielle de l'amidon de maïs, les grains sont trempés dans une solution alcaline qui en dissout l'écorce. Le liquide obtenu, riche en acides aminés et en polypeptides, est utilisé comme milieu de culture.

est effectuée par l'eau distillée. La polymyxine est ensuite extraite de l'éluat par cristallisation de son picrate. Le passage d'un courant d'acide chlorhydrique gazeux dans la solution acétonique du picrate, amène la précipitation du chlorhydrate de polymyxine. Au cours de la préparation, l'activité des différents milieux et extraits est titrée par la technique de WAKSMAN au moyen de Shigella gallinarum.

Nous avons schématisé, dans le tableau I, les différentes étapes de la préparation de la polymyxine D, à partir de 1109 litres de bouillon de culture de la souche B 71 (PORTER et coll.) (14).

B - PURIFICATION

La polymyxine obtenue à ce stade est impure : il est possible que l'action toxique de ce médicament soit due précisément à l'existence d'impuretés (BROWNLEE et BUSHEY) (15).

La polymyxine brute peut être purifiée par différentes techniques :

1 - Cristallisation

Les polymyxines peuvent être purifiées par cristallisation des picrates (PORTER et coll.) (16), des 2-naphtalène-sulfonates (WILKINSON) (17), des hélianthates (CATCH et Al.) (18), et des reineckates (PETERSON et REINECKE) (19). Les polymyxines B et E peuvent être obtenues par précipitation des bases par action de l'ammoniaque sur la solution bouillante des sulfates correspondants (WILKINSON) (20).

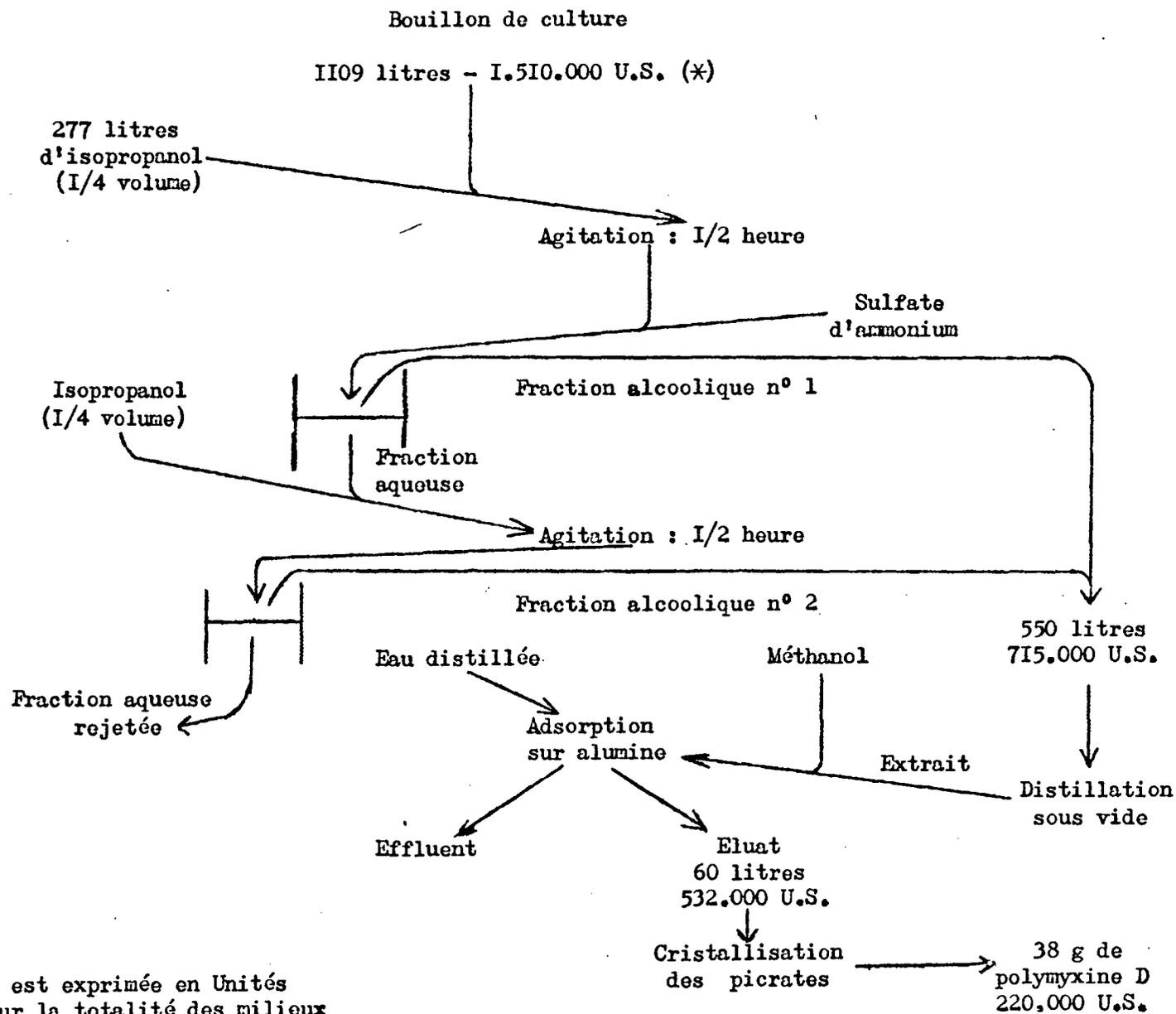
2 - Chromatographie de partage sur colonne

La purification peut être effectuée sur des colonnes d'Hyflo-Supercel ; la phase stationnaire est un tampon de pH 2 ; la phase mobile est constituée par du n-butanol saturé de tampon (BELL et coll.) (21).

La figure 1 montre l'exemple donné par BELL de la purification des polymyxines A et D.

TABEAU 1

Isolement de la polymyxine D des bouillons de culture de Bacillus polymyxa (souche B 71) (d'après PORTER et coll.)(14)



(*) L'activité est exprimée en Unités Shigella sur la totalité des milieux et extraits.

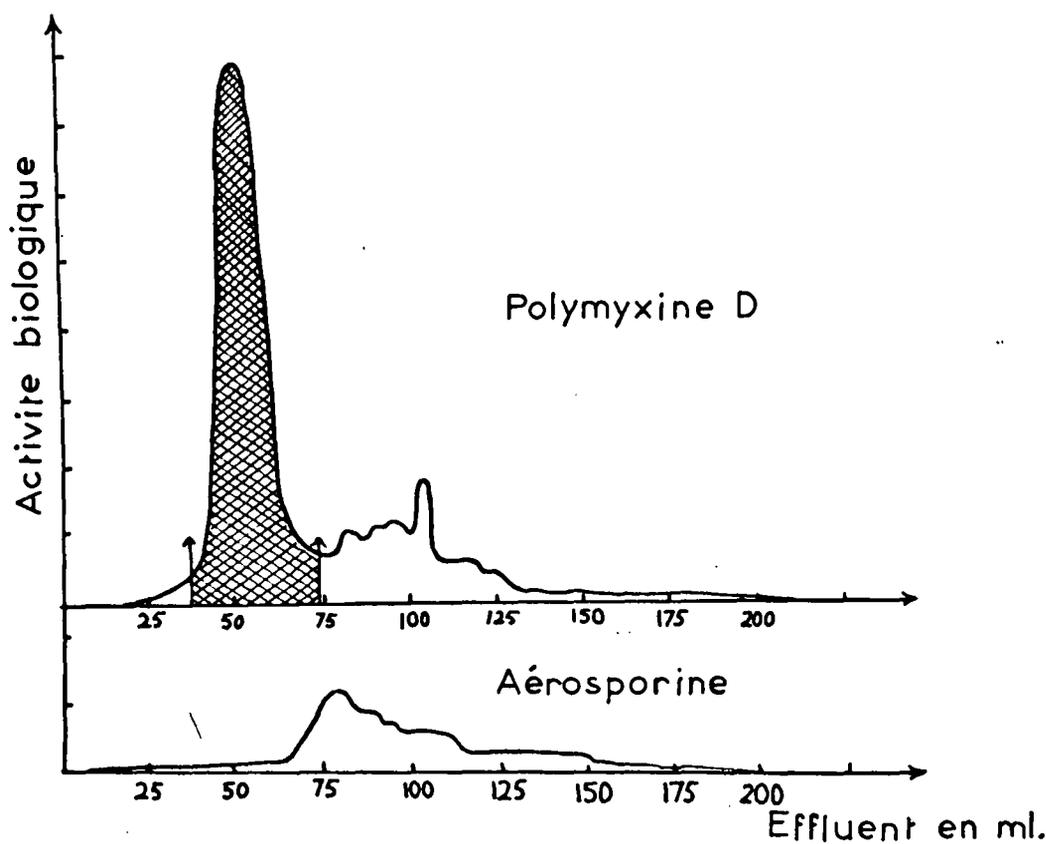


Figure 1

Chromatographie de partage des polymyxines A et D sur une colonne d'Hyflo-Supercel
(d'après BELL et coll.)(21)

Système n-butanol - tampon sulfosuccinate de sodium 0,015 M de pH 2. La récupération des tubes 25 à 75 fournit une polymyxine D homogène à la distribution à contre-courant.

Un procédé analogue peut être utilisé pour séparer les circulines A et B (DOWLING et coll.) (22).

3 - Chromatographie de partage sur papier

La purification et le fractionnement des polymyxines peuvent être réalisés par chromatographie de partage sur papier. Le Tableau II rassemble les principaux résultats obtenus :

TABLEAU II

R_f des différentes polyxymines sur papier Whatman n° 1

Solvant A (NASH) (23) : n-butanol - tampon glyco-colle - HCl 0,2 M pH 2,5

Solvant B (DAUTREVAUX) : n-butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5).

| | Solvant A | Solvant B |
|--------------|-----------|-----------|
| Polymyxine A | 0,18 | 0,07 |
| Polymyxine B | 0,56 | 0,24 |
| Polymyxine D | 0,38 | - |
| Polymyxine E | 0,54 | 0,39 |
| Circuline | - | 0,30 |
| Colimycine | - | 0,35 |

D'autres solvants à base de butanol et d'acide acétique ont encore été utilisés ; DOWLING et coll., (24) avec un système n-butanol, acide acétique et eau pauvre en acide acétique (49,5 : 1 : 49,5) ont ainsi pu séparer la circuline en cinq constituants biologiquement actifs, dont deux ont été identifiés sous les noms de circuline A et B.

4 - Distribution à contre-courant

Cette élégante méthode a servi à contrôler la pureté des polymyxines préparées par d'autres méthodes. C'est ainsi que BELL a pu vérifier l'homogénéité du composant majeur, isolé par chromatographie, de la polymyxine D sur Hyflo-Supercel (tubes 25 à 75 de la Figure 1).

La distribution à contre-courant a, en outre, permis à HAUSMANN et CRAIG (25), de séparer la polymyxine B en deux constituants actifs : les polymyxines B₁ et B₂. La Figure 2 montre l'aspect de la courbe de distribution ainsi obtenue dans le fractionnement de la polymyxine B.

—ooOoo—

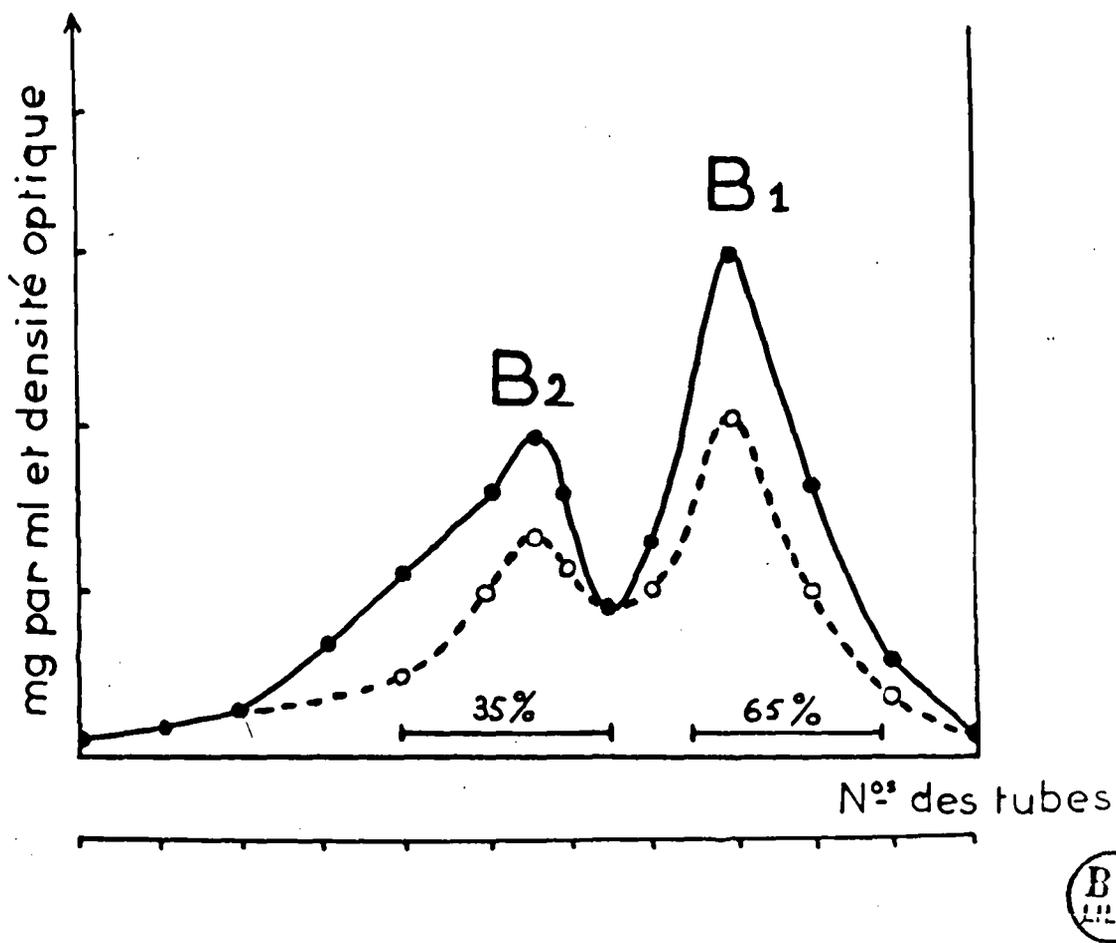


Figure 2

Séparation des polymyxines B₁ et B₂ par distribution à contre-courant (d'après

HAUSSMANN et CRAIG)(25)

Système 2-Butanol/HCl 0,1 N

●—●—●: concentration dans la phase inférieure.

○- -○- -○: densité optique dans la phase inférieure à 259 mμ.



CHAPITRE III

PROPRIETES PHYSIQUES DES POLYMYXINES

A - SOLUBILITE

Les polypeptides du groupe des polymyxines se présentent sous la forme d'une poudre amorphe blanche qui fond en se décomposant, aux environs de 230°C :

| | | |
|--------------|------------|------------------------|
| Polymyxine A | 230°-235°C | (CATCH et al.) (26) |
| Polymyxine D | 228°-230°C | (BELL et coll.) (27) |
| Circuline | 226°-228°C | (PETERSON et al.) (28) |

Les polymyxines sont très solubles dans l'eau et le méthanol (plus de 40 grammes pour 100 ml). Elles sont plus solubles en milieu acide qu'en milieu alcalin ; on peut d'ailleurs précipiter les polymyxines B et E en saturant une solution concentrée de leur chlorhydrate, par de l'ammoniaque. Leur solubilité dans les alcools décroît quand le poids moléculaire de l'alcool augmente. Elles sont, enfin, insolubles dans des solvants organiques comme les esters, les éthers, les cétones ou les hydrocarbures.

Les polymyxines forment, en outre, des combinaisons insolubles dans l'eau avec divers réactifs, notamment l'acide picrique, l'acide hélianthique, le reineckate d'ammonium ; certains de ces dérivés peuvent être obtenus à l'état cristallisé. Nous avons vu l'utilisation de ces combinaisons pour la purification des polymyxines.

B - POUVOIR ROTATOIRE

Les polymyxines présentent toutes un pouvoir rotatoire lévogyre :

TABLEAU III

Pouvoir rotatoire des polymyxines

| | | | |
|---------------------------|--------------------------------|--|---------------------------|
| Polymyxine A | $\alpha_D^{20} = - 42^\circ$ | C = 1 ^o / _o dans l'eau | CATCH et al. (29) |
| Polymyxine B | $\alpha_D^{25} = - 75^\circ 7$ | C = 1 ^o / _o dans l'éthanol à 75 ^o / _o | REGNA et coll. (30) |
| Polymyxine B ₁ | $\alpha_D^{25} = - 85^\circ 1$ | C = 2,33 ^o / _o dans l'éthanol à 75 ^o / _o | HAUSMANN et CRAIG (31) |
| Polymyxine D | $\alpha_D^{25} = - 40^\circ$ | C = 1,05 ^o / _o dans l'eau | BELL et coll. (32) |
| Circuline | $\alpha_D^{25} = - 61^\circ 6$ | C = 1,25 ^o / _o dans l'eau | PETERSON et REINECKE (33) |

C - COURBES DE TITRATION

Les courbes de titration électrométrique sont intéressantes à analyser. JONES (34) a notamment étudié les polymyxines A, B, C et D, alors que PETERSON et REINECKE (35) ont réalisé les courbes de titration de la circuline (Figure 3).

L'aspect de ces courbes montre que les polymyxines sont des substances très basiques ; mais, ces courbes présentent deux points d'inflexion supplémentaires qui ne sont pas identiques pour les quatre préparations. Le point d'inflexion situé dans les régions les plus alcalines de la courbe des polymyxines A, C et D est à peine marqué et son importance peut être négligée en raison des erreurs expérimentales ; il n'en est pas de même de la polymyxine B, dont le point d'inflexion à pH 9 - 10 est très net. L'explication de cette irrégularité dans la courbe de titration n'a pas encore été donnée.

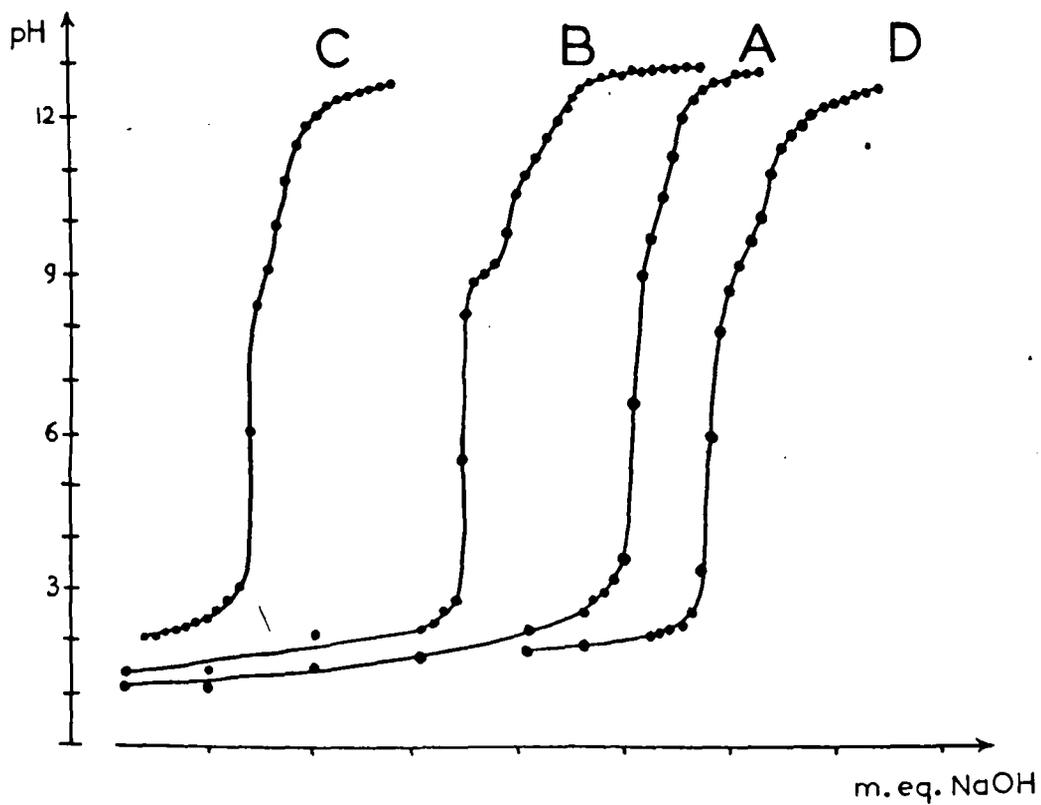


Figure 3

Courbes de titration électrométrique des polymyxines

(d'après JONES) (34)

Solution de polymyxine à 0,2 p.100 dans l'eau. Titration par la soude N.

Pour la clarté de la présentation, les courbes commencent à une valeur arbitraire de l'abscisse.

D - SPECTRE ULTRA-VIOLET

Les polymyxines B et C absorbent la lumière dans l'ultra-violet : le maximum d'absorption est obtenu à 259 m μ et s'explique par la présence de phénylalanine dans la molécule. Au contraire, les polymyxines A et E et la circuline ne présentent aucun maximum d'absorption caractéristique dans leur spectre ultra-violet (BELL). (37).

E - POIDS MOLECULAIRE

Le poids moléculaire minimum des peptides peut être calculé à partir de la composition en acides aminés (voir plus loin) : ce poids moléculaire minimum équivaut à la somme des poids moléculaires de chacun des acides aminés constitutifs, diminué d'autant de fois le poids moléculaire de l'eau qu'il y a de liaisons peptidiques dans la molécule.

Le poids moléculaire de la polymyxine B₁ a été notamment déterminé par HAUSMANN et CRAIG (38), au moyen de la méthode de substitution partielle de BATTERSBY et CRAIG (39) : le peptide ou la protéine est partiellement substitué par le 2,4-dinitrofluorobenzène (*). Les différents dinitrophényl-peptides obtenus, mono-DNP-peptides, di-DNP-peptides, etc..., sont séparés par la technique de distribution à contre-courant de CRAIG (40). On détermine enfin, sur une ou plusieurs des fractions obtenues, le coefficient d'extinction moléculaire relatif à chaque DNP-peptide.

La substitution d'un peptide par le radical dinitrophényl affecte les fonctions aminées, les fonctions OH et SH de la tyrosine et de la cystéine, et le noyau imidazole de l'histidine. Nous verrons plus loin que, dans les polymyxines, les seuls groupements substituables sont les fonctions α -NH₂ de l'acide α , γ -diaminobutyrique.

(*) 2,4-dinitrofluorobenzène : par abréviation DNFB.
Dinitrophényl-peptides : par abréviation DNP-peptides.

Quand on effectue la dinitrophénylation partielle d'un peptide en vue de la détermination de son poids moléculaire, on suit la marche de la réaction que l'on arrête quand il y a approximativement fixation globale d'un radical DNP par équivalent-gramme de peptide. Au cours de cette substitution partielle, il se forme des dérivés mono, di, ou tridinitrophénylés, tandis qu'une partie du peptide initial reste non substituée (*).

Après dinitrophénylation, le DNFB en excès, est éliminé du milieu réactionnel par extractions répétées à l'éther, et les produits de substitution partielle sont fractionnés par distribution à contre-courant.

La courbe de distribution obtenue à partir de la polymyxine B₁ par HAUSMAN et CRAIG (Figure 4), montre la présence de 4 constituants.

La première fraction est constituée par les sels minéraux apportés au cours de la dinitrophénylation.

La deuxième, non colorée, correspond à la polymyxine B₁, non dinitrophénylée.

La troisième fraction, colorée en jaune, est hétérogène : elle est constituée par un mélange de dérivés mono-dinitrophénylés. Ces dérivés peuvent être séparés par distribution à contre-courant dans un autre système-solvant, mais ce fractionnement est inutile puisque tous ces dérivés mono-dinitrophénylés ont le même poids moléculaire.

La quatrième fraction, enfin, est complexe et contient vraisemblablement un mélange de dérivés plurisubstitués.

(*) Dans le cas de la tyrocidine, étudiée par BATTERSBY et CRAIG, les seules fonctions substituables sont le γ -NH₂ de l'ornithine et le groupement phénolique de la tyrosine : le produit de substitution partielle de ce peptide est constitué de la tyrocidine non substituée, de l'O-DNP-tyrocidine et de la di-DNP-(O,N)tyrocidine (41).

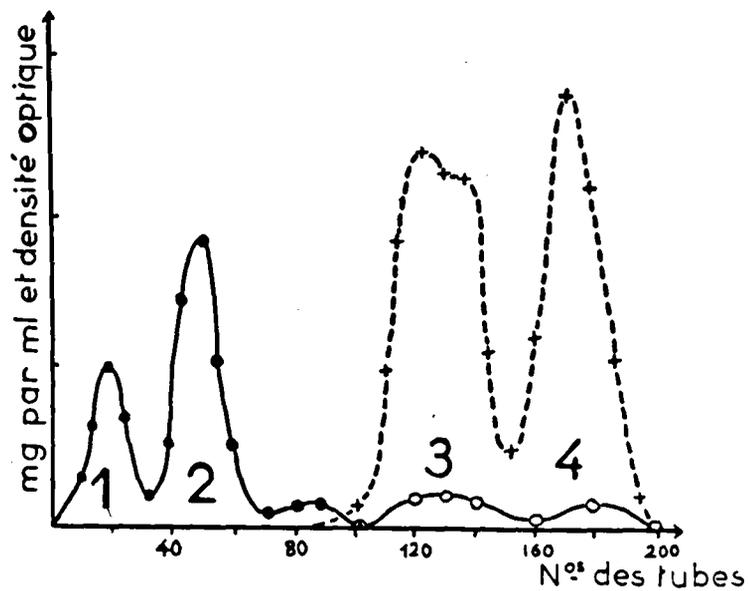


Figure 4

Courbe de distribution des produits de substitution partielle de la polymyxine B par
le 2,4-dinitrofluorobenzène (d'après HAUSMANN et CRAIG) (38)
(d'après HAUSMANN et CRAIG) (38)

Système n -butanol/H Cl 0,1 N

○—○—○ : phase inférieure ; concentration

○—○—○ : phase supérieure ; concentration

+—+—+ : phase supérieure ; densité optique à 350 m .

La troisième fraction correspondant à la mono-DNP-polymyxine B₁, est intéressante ; son coefficient d'extinction à 350 m μ (par milligramme et par millilitre) est de 9,89 : il permet, connaissant le coefficient d'extinction moléculaire de l'acide γ -DNP-diaminobutyrique à 350 m μ (14.500), le calcul du poids moléculaire du dérivé mono-dinitrophénylé de la polymyxine B₁ (HAUSMANN et CRAIG) (42) :

$$\frac{14.500}{9,89} = 1466$$

En soustrayant de ce résultat, d'une part le poids moléculaire du radical DNP (167) diminué de celui de l'hydrogène qu'il remplace dans le dérivé substitué, et d'autre part le poids des quatre acides chlorhydriques fixés à la polymyxine, on obtient une valeur de 1154.

D'autres méthodes purement physiques ont encore été utilisées.

BELL et coll., (43), par mesure des pressions osmotiques, ont trouvé respectivement les valeurs de 1293 et 1150 pour les polymyxines A et D.

FEW et SCHULMANN (44), par étude des films monomoléculaires, ont obtenu pour les polymyxines A, B, D et E, un poids moléculaire voisin de 1250.

Ces divers résultats sont en bon accord, non seulement entre eux, mais avec la valeur du poids moléculaire minimum calculé à partir de la composition en acides aminés (Tableau IV).

TABLEAU IV

Poids moléculaire des polymyxines

| Polymyxines | A | B | D | E | Polypeptino | Méthode |
|--------------------------------|------|---------------|------|------|-------------|----------------------------------|
| HAUSMANN et CRAIG (38) (42) | | 1150 ± 100 | | | 1100 à 1200 | Substitution partielle |
| FEW et SCHULMAN (44) | 1250 | 1280 ± 70 | 1250 | 1250 | | Etude des films monomoléculaires |
| BELL et coll.(43) | 1293 | | 1150 | | | Mesure des pressions osmotiques |
| P.M. minimum théo- rique | - | 1220 | 1144 | - | 1145 | |

CHAPITRE IV

COMPOSITION DES POLYMYXINES

La nature peptidique de la polymyxine A a été établie par JONES (45). Les polymyxines sont d'ailleurs des polypeptides hétéromériques, puisqu'ils contiennent, en plus des acides aminés, une molécule d'acide gras.

A - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES

I - TECHNIQUES UTILISEES

L'étude de la composition d'un peptide en amino-acides comprend trois phases :

- Hydrolyse totale du peptide,
- Identification des acides aminés,
- Dosage des acides aminés.

a) - Hydrolyse totale :

L'hydrolyse totale d'une chaîne polypeptidique a pour effet d'en libérer tous les acides aminés constitutifs par rupture de la liaison peptidique.

Nous avons toujours utilisé les conditions opératoires suivantes :

- Emploi de l'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé deux fois dans un appareil en verre. L'acide chlorhydrique contient, en effet, des substances oxydantes provoquant, au cours de l'hydrolyse, la destruction de quantités plus ou moins importantes d'acides aminés. Cet acide chlorhydrique 5,6 N constitue le mélange azéotrope du système HCl/eau : son point d'ébullition est de 110°C ;

- L'hydrolyse est effectuée en tube scellé à l'étuve à 100-105°C pendant 24 heures. Cette durée d'hydrolyse est suffisante pour provoquer la rupture de toutes les liaisons peptidiques, y compris les liaisons Valine-Valine ou Leucine-Valine, qui sont les plus résistantes (SYNGE) (46).

- Une fois l'hydrolyse terminée, l'acide chlorhydrique est éliminé soit par évaporations répétées dans un exsiccateur à vide, soit par passage sur une petite colonne de résine à échange de cations (Amberlite IR 120) et élution par l'ammoniaque 2 N.

b) Identification des acides aminés :

A l'heure actuelle, la chromatographie de partage sur papier constitue le procédé le plus simple d'identification des amino-acides.

Nous avons utilisé de manière habituelle, la chromatographie bidimensionnelle, sur papier Whatman n° 1 à 20°C, au moyen des solvants chromatographiques suivants :

En première dimension : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) pendant 24 à 36 heures (PARTRIDGE) (47)

En deuxième dimension : phénol saturé d'eau en présence d'ammoniaque (3 p.100 dans la phase aqueuse), pendant 18 à 24 heures (PARTRIDGE) (48).

On obtient, par cette technique, une bonne résolution de la plupart des acides aminés. La Fig.5 montre la localisation des principaux d'entr'eux sur le chromatogramme.

Les acides aminés basiques (lysine, arginine, etc...) restent difficilement identifiables. Il est alors souvent nécessaire d'effectuer la chromatographie dans le système phénol/métacrésol (phénol/métacrésol/eau (1 : 1 : 1) ; 3 p.100 d'ammoniaque dans la phase aqueuse) (GRASSMANN et HANNIG) (49).

L'acide α , γ -diaminobutyrique se place dans le groupe des acides aminés basiques avec les R_F suivants : butanol/acide acétique : 0,07 - phénol (3 p.100 NH_3):0,65.

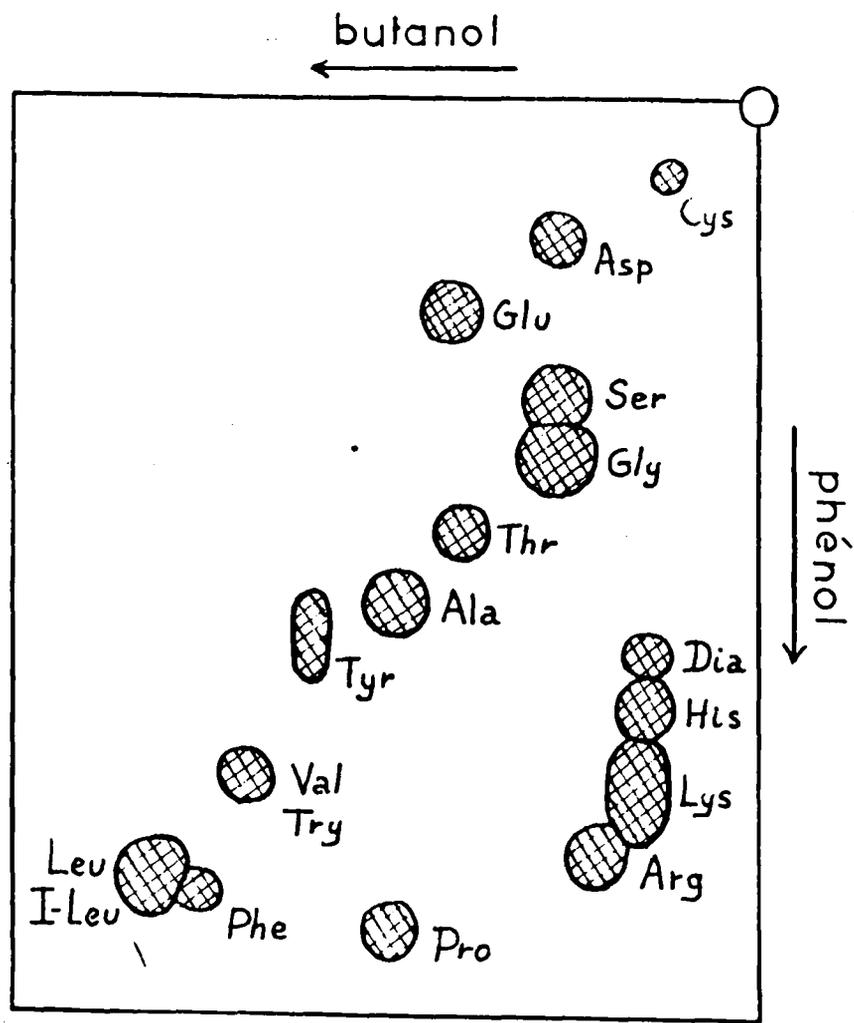


Figure 5

Schéma de chromatogramme bidimensionnel des principaux acides aminés.

1ère dimension : butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5)

2ème dimension : phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale (3 p.100) et en présence d'HCN.

Abréviations

- | | | |
|---------------------|---------------------------------------|------------------------|
| Ala = Alanine | Arg = Arginine | Asp = Acide aspartique |
| Cys = Cystéine | Dia = Acide α,γ -diamino- | Glu = Acido glutamique |
| Gly = Glycocolle | butyrique | His = Histidine |
| I-Leu = Isoleucine | Leu = Leucine | Lys = Lysine |
| Phe = Phénylalanine | Pro = Proline | Ser = Sérine |
| Thr = Thréonine | Try = Tryptophanne | Tyr = Tyrosine |
| | Val = Valine | |

La leucine et l'isoleucine occupent la même place sur ce type de chromatogramme bidimensionnel : on peut les différencier dans le système butanol/alcool benzylique/eau (1 : 1 : 1) (CONSDEN) (50). Un développement chromatographique de 3 à 4 jours, en laissant passer le front du solvant, est alors nécessaire.

c) Dosage des acides aminés :

Le dosage des acides aminés constitutifs d'une protéine a toujours constitué un problème délicat encore imparfaitement résolu : ceci explique le grand nombre et la variété des techniques qui ont été décrites.

La méthode chromatographique de MOORE et STEIN (51) constitue le procédé le plus sûr et le plus précis ; elle est malheureusement longue et délicate. Etant donné la relative simplicité des substrats étudiés, nous avons donc été amenés à choisir une méthode peut-être un peu moins précise, mais d'application plus aisée. Nous avons essentiellement utilisé les techniques de GRASSMANN et HANNIG et de LEVY.

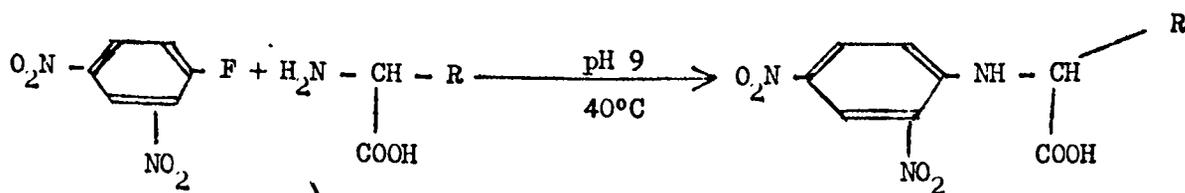
-a) Technique dérivée de celle de GRASSMANN et HANNIG (52). Dans la technique originale de GRASSMANN, les acides aminés de l'hydrolysate peptidique sont séparés par électrophorèse, puis par chromatographie sur papier. Dans le cas des polymyxines, la séparation des acides aminés peut être obtenue par la seule chromatographie unidimensionnelle sur papier (SCHLEICHER et SCHULL N° 2040-a) dans le système butanol/acide acétique.

La solution d'acides aminés est déposée sous forme d'une traînée fine et régulière de 1 cm. de longueur sur une ligne de départ ; on effectue ainsi un certain nombre de traînées séparées l'une de l'autre par une distance de 4 à 5 cm. ; ces traînées sont constituées alternativement par des quantités croissantes de l'hydrolysate peptidique et par des solutions d'acides aminés témoins, de concentration connue et croissante (5 microlitres de solutions 0,004 à 0,020 M).

Après chromatographie, les feuilles sont soigneusement séchées sous une hotte ventilée ; après immersion dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,2 p.100,

les chromatogrammes sont placés dans une étuve à 100°C en atmosphère saturée d'eau pendant 15 minutes. Après révélation, les feuilles sont découpées dans le sens du développement chromatographique ; les bandes obtenues sont alors huilées par immersion dans de l'huile de vaseline, ou mieux, dans un mélange d'huile de vaseline et de α -bromo-naphtalène (85 :15), puis essorées par pression entre deux feuilles de papier filtre. On apprécie enfin l'intensité de coloration des taches, par passage des bandes dans un photomètre muni d'un filtre à 530 m μ . On obtient ainsi une courbe d'intensité de coloration pour chaque tache, courbe dont la surface est proportionnelle à la quantité d'acide aminé mise en jeu.

- β) Méthode aux dinitrophénylaminoacides de LEVY (53). Dans cette élégante méthode, le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) est condensé avec l'ensemble des acides aminés de l'hydrolysât total suivant la réaction de SANGER (54).



Les dinitrophénylamino-acides (DNP-AA) obtenus sont alors séparés par chromatographie sur papier, les taches sont éluées et les solutions dosées au spectrophotomètre.

La dinitrophénylation s'effectue à pH 9 et à 40°C sous agitation, le pH étant maintenu constant par addition de soude. Dans ces conditions, la dinitrophénylation est complète en 1 h.30min. et il ne se forme que des quantités minimales de 2,4-dinitrophénol (DNP-OH), artéfact provenant de l'hydrolyse du DNFB.

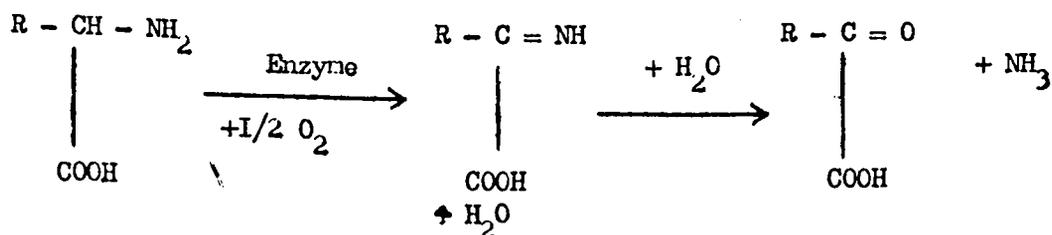
Après réaction, on enlève l'excès de DNFB par quelques extractions à l'éther dans une ampoule à décanter.

Les DNP-AA sont alors extraits à l'éther en milieu acide. Le résidu jaune obtenu par évaporation de l'extrait est alors soumis à un vide poussé à 40°C, ce qui provoque la sublimation des petites quantités de DNP-OH qui auraient pu se former (Voir plus loin).

Une quantité aliquote du résidu est alors soumise à une chromatographie bi-dimensionnelle dans les solvants toluène et tampon phosphate de LEVY (Voir plus loin).

Après chromatographie, les taches jaunes correspondant aux DNP-amino-acides sont localisées en lumière de WOOD, découpées et éluées par chauffage à 60°C, pendant 30 minutes, dans une solution de bicarbonate de sodium à 2 p.100. La coloration jaune de la solution obtenue par centrifugation est alors mesurée au spectrophotomètre à 350 mμ.

Le problème du dosage des acides aminés était compliqué dans le cas des polymyxines par la présence d'acides aminés de la forme D. Nous avons donc effectué des dosages des acides aminés avant et après action de la D-acidaminodéshydrogénase du rein de Mouton. Cet enzyme désamine spécifiquement les acides aminés de la forme D selon la réaction :



La réaction s'effectue en mettant en contact à 37°C, en présence d'oxygène, l'hydrolysate de polymyxine avec une préparation purifiée de D-acidaminodéshydrogénase de rein de Mouton (55). Au bout de 2 à 3 heures d'incubation, l'enzyme est précipité par la chaleur et le filtrat déminéralisé par passage sur une petite colonne de résine à échange de cations. Le dosage des acides aminés est alors réalisé selon les modalités que nous venons de décrire.

2 - RESULTATS

La chromatographie de partage sur papier a permis l'identification facile des acides aminés constitutifs des polymyxines. Le problème a, malgré tout, été compliqué par la présence, en quantité importante, sur les chromatogrammes, d'une tache "ninhydrine positive", dont les R_F ne correspondaient à ceux d'aucun acide aminé

connu. BELL et coll. (56) l'ont identifié comme étant l'acide α, γ -diaminobutyrique. L'analyse élémentaire et l'étude du dérivé γ -dinitrophénylé et de l'hydantoïne de cet acide aminé ont été comparées aux données correspondantes de l'acide α, γ -diaminobutyrique de synthèse.

Les acides aminés des différentes polymyxines ne se trouvent pas exclusivement sous la forme L naturelle ; un certain nombre appartiennent, en effet, à la série D.

Le Tableau V rassemble la composition des différentes polymyxines.

TABLEAU V

Composition des polymyxines

| | Leu | Phe | Thr | Ser | Dia | Val | I-Leu | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-------|----------------------|
| Polymyxine A | D | | L | | L et D | | | |
| Polymyxine B | 1 L | 1 D | 2 L | | 5 L 1 D | | | HAUSMANN et al. (57) |
| Polymyxine C | | L | L | | L | | | |
| Polymyxine D | 1 D | | 3 L | 1 D | 5 L | | | BELL et coll. (58) |
| Polymyxine E | D | | L | | L | | | |
| Circuline | 1 D | | 1 L | | 5 L | | | PETERSON et al. (59) |
| Polypeptine | 2 L | 1 D | 1 L | | 3 L | 1 D | 1 L | HAUSMANN et al. (60) |
| Colistine | 1 | | 1 | | 4 | | | DAUTREVAUX |

Dans le Tableau VI, nous présentons les résultats de nos dosages par la méthode de GRASSMANN et HANNIG (61) sur la polymyxine B.

TABLEAU VI

Dosage des D et L amino-acides de la polymyxine B par la méthode de GRASSMANN et HANNIG

| | Avant désamination | | Après désamination | |
|-------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | p. 100 | Nombre de Molécules | p. 100 | Nombre de Molécules |
| DIA | 60,4 | 6,04 | 63,8 | 5,10 |
| THR | 18,5 | 1,85 | 24,3 | 1,96 |
| LEU | 10,7 | 1,07 | 11,9 | 0,95 |
| PHE | 10,4 | 1,04 | (Figure 6) | 0 |
| TOTAL | 100 | 10 | 100 | 8 |

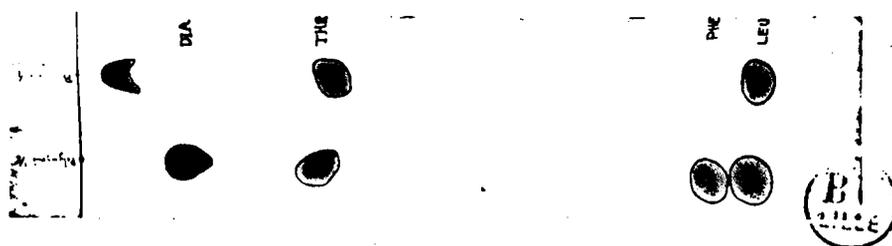


Figure 6

Etude qualitative des acides aminés constitutifs de la polymyxine B - Chromatogramme unidimensionnel de l'hydrolysate total de polymyxine B avant (à gauche) et après (à droite) action de la D-acidaminodéshydrogénase du rein de Mouton. Après désamination, la phénylalanine a complètement disparu. Système n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5)

B - L'ACIDE GRAS

Nous avons vu que les acides aminés n'étaient pas les seuls constituants des polymyxines. BELL et coll. (62) remarquèrent, en effet, qu'aux acides aminés de la polymyxine D, il fallait ajouter une substance non azotée, extractible à l'éther de pétrole.

L'analyse élémentaire de cette substance a donné les résultats suivants:

C 68,4 p.100
 H 11,4 p.100
 O 20,2 p.100 (par différence)

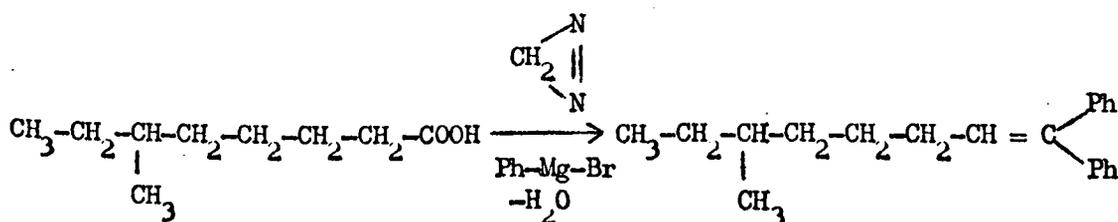
Ces données conduisirent BELL à considérer qu'il s'agissait d'un acide organique à 9 atomes de carbones, dont la composition élémentaire théorique serait :

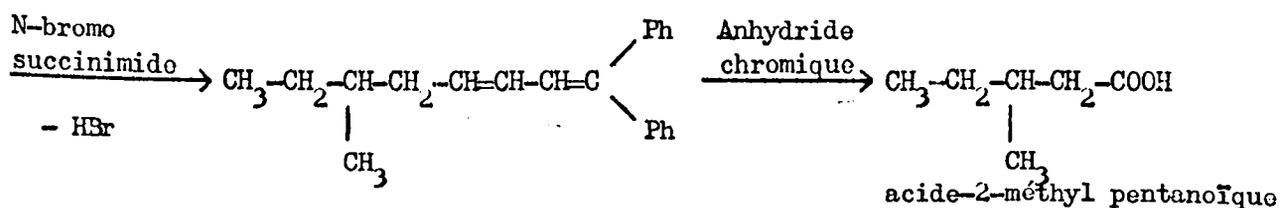
C 69,2 p.100
 H 11,6 p.100
 O 19,2 p.100

Cet acide gras présente des propriétés analogues, mais non identiques à celles de l'acide pélargonique ou acide nonanoïque normal. GORE et PETERSEN (63) par l'étude des spectres infra-rouges de cet acide gras et de l'acide pélargonique, ont confirmé leur non-identité. WILKINSON (64), par dégradation de l'ester méthylique de l'acide gras de la polymyxine D, a pu isoler l'acide 3-méthyl-pentanoïque (Schéma I).

SCHEMA I

Dégradation de l'acide 6-méthyl octanoïque





Par comparaison de cet acide avec l'acide obtenu par résolution du sel de quinine de l'acide 6-méthyl-pentanoïque racémique de synthèse, ils ont pu établir qu'il se trouvait sous la forme D. CATCH et al. (65) ont confirmé que la polymyxine D contenait de l'acide d-6-méthyl octanoïque par la mesure du pouvoir rotatoire de cet acide ($\alpha_D^{21} = + 8,6^\circ - C = 2,22$ dans l'éther).

Cet acide gras semble commun à la plupart des polymyxines, y compris le groupe de la circuline. La polymyxine B₂ fait exception à cette règle : d'après HAUSMANN et CRAIG (66), il s'agirait d'un acide gras en C₈.

Dans la polypeptine, l'acide gras serait un acide hydroxyheptanoïque (CRAIG) (67).

CHAPITRE V

DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES POLYMYXINES

La détermination de la séquence en acides aminés d'un polypeptide comprend les stades suivants :

A - Etude des acides aminés terminaux

B - Etude de l'enchaînement

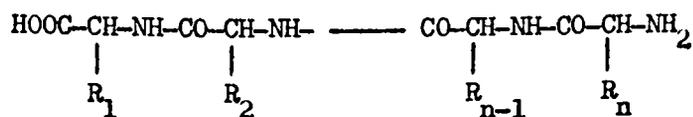
1 - Hydrolyse partielle

2 - Fractionnement des petits peptides de l'hydrolysate partiel

3 - Etude de ces petits peptides

A - ACIDES AMINES TERMINAUX

La chaîne peptidique classique est constituée par la succession d'un certain nombre d'acides aminés réunis entre eux par des liaisons peptidiques :



La chaîne peptidique est donc terminée par un acide aminé porteur d'un groupement α -carboxylique libre d'une part, et par un acide aminé porteur d'un groupement α -aminé libre d'autre part. La détermination de ces acides aminés terminaux est importante et constitue le premier stade de l'étude structurale d'un polypeptide ou d'une protéine. Cette détermination permet, par exemple, de résoudre le problème du nombre de chaînes peptidiques constituant la molécule protéique (cas de l'insuline, SANGER (68)). Dans le cas des polypeptides, on obtient de cette façon, des points de repère importants dans l'étude de la séquence ; l'application de certaines

méthodes de dégradation récurrente, à partir des extrémités terminales permet, en outre, l'étude directe des séquences terminales.

1 - PRINCIPES DES METHODES

L'étude des extrémités terminales des polypeptides peut se faire, soit par libération enzymatique des acides aminés terminaux, soit par substitution chimique des carboxyles et fonctions aminées libres et identification des produits de condensation.

a) Méthodes enzymatiques

La leucine-aminopolypeptidase (WALDSCHMIDT-LEITZ) (69) libère les acides aminés N-terminaux (*). La spécificité de cet enzyme vis-à-vis de la leucine en position N-terminale s'étend, en réalité, à tous les acides aminés N-terminaux. La carboxypeptidase (LENS) (70), au contraire, détache spécifiquement les acides aminés C-terminaux (à l'exception de la proline et de l'hydroxyproline). Les amino-acides libérés sont identifiés par chromatographie de partage sur papier, soit sous forme libre, soit sous forme de DNP-amino-acides (Voir plus loin).

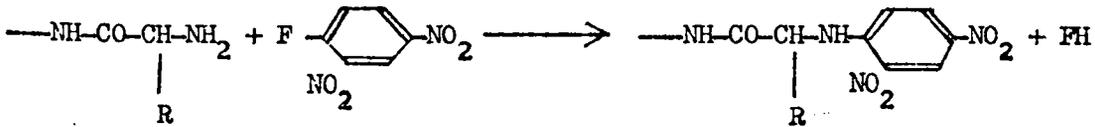
Après l'enlèvement de l'acide aminé terminal, ces enzymes continuent leur action sur le reste de la chaîne peptidique, en libérant le nouvel acide aminé terminal : cette méthode de dégradation récurrente permet de déterminer les séquences terminales d'une chaîne peptidique.

b) Méthodes chimiques

a) Détermination des groupements α -aminés libres :

1- Méthode des dinitrophényl-amino-acides de SANGER (71). Elle consiste à condenser les groupements α -NH₂ de la protéine avec le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB), selon la réaction :

(*) Par abréviation, nous donnerons aux acides aminés terminaux respectivement porteurs d'une fonction α -carboxylique et α -aminée libre, le nom d'acides aminés C-terminaux et acides aminés N-terminaux.



Au cours de cette condensation, le radical dinitrophényl se fixe également sur les groupements ω-aminés de la lysine, de l'ornithine et de l'acide α-γ-diaminobutyrique, les groupements thiol de la cystéine et phénolique de la tyrosine, ainsi que sur le noyau imidazolique de l'histidine.

Après hydrolyse du produit de condensation (DNP-polypeptide), les DNP-aminoacides terminaux peuvent être isolés et identifiés par chromatographie de partage. La plupart de ces DNP-aminoacides sont éthérosolubles. Cependant, quelques-uns (DNP-acide cystéique, DNP-arginine,...) sont hydrosolubles. On peut, d'autre part, doser spectrophotométriquement les DNP-aminoacides à leur maximum d'absorption à 3600 Å.

2- Méthode des phényl-thiohydantoïnes de EDMAN (72). Elle consiste à condenser le groupement α-aminé libre avec le phénylthio-isocyanate. Puis, en milieu chlorhydrique anhydre, on peut isoler la phénylthiohydantoïne du résidu amino-acide porteur d'un groupement α-aminé libre terminal. La phénylthiohydantoïne est alors identifiée directement par chromatographie de partage sur papier (SJOQUIST) (73), (LANDMANN et coll.) (74), (TOENNIES) (75).

La suite des réactions est schématisée dans le Schéma II.

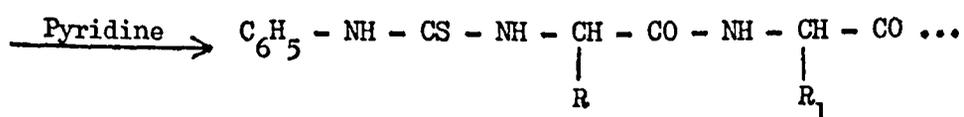
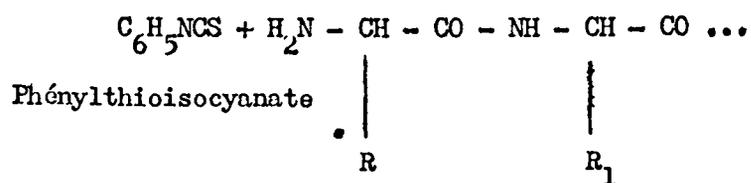
La méthode de EDMAN peut, d'autre part, être considérée comme une méthode de dégradation contrôlée. En effet, après l'enlèvement de la phénylthiohydantoïne de l'acide aminé terminal, le reste de la chaîne peptidique est, en principe, intact et il est possible de recommencer la condensation plusieurs fois de suite.

β) Détermination des groupements carboxyliques libres :

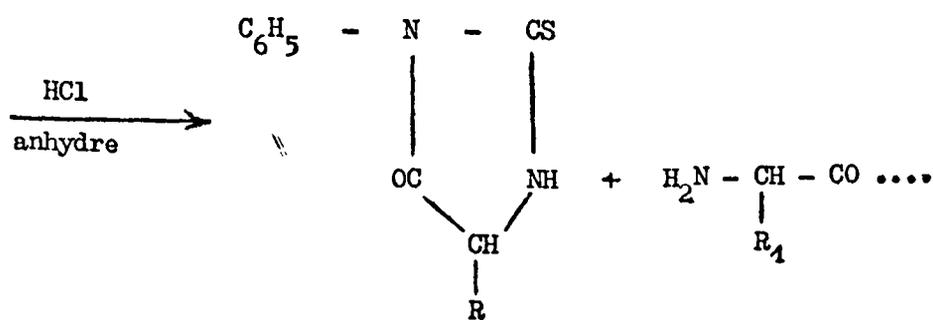
1- Méthodes de réduction : Les groupements α-carboxyliques peuvent être réduits en alcools primaires par l'hydrure double de lithium et d'aluminium (FROMAGEOT et

SCHEMA II

Schéma de la méthode EDMAN



Phénylthiocarbamylpeptide (PTC-peptide)



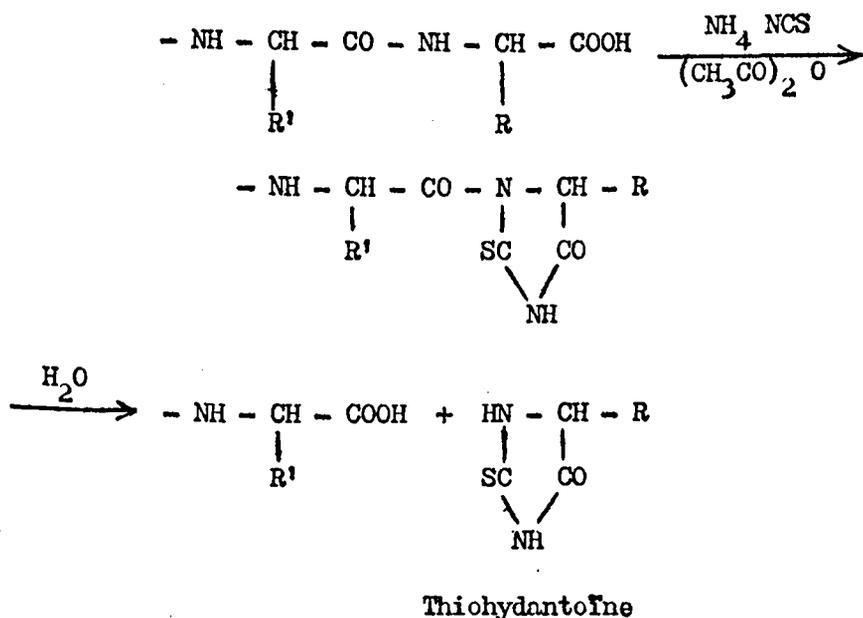
Phénylthiohydantoiné

coll.) (76) ou par l'hydrure double de lithium et de bore (CHIBNALL et REES) (77).
Après hydrolyse de la protéine ainsi traitée, on peut identifier et doser les amino-alcools primaires, soit directement par chromatographie sur papier, soit par chromatographie sur papier des DNP-amino-alcools correspondants.

2- Méthode des thiohydantoïnes : Un autre type de méthode chimique de détermination du groupement carboxylique libre réside dans la formation de la thiohydantoïne (méthode de SCHLACK et KUMPF (78) appliquée aux polypeptides par TIBBS) (79). Le polypeptide acylé (acétylé, benzylé ou carbobenzoxylé) est traité par le thiocyanate d'ammonium en présence d'anhydride acétique et d'acide acétique (Voir Schéma III). La thiohydantoïne ainsi formée peut être isolée du reste de la chaîne peptidique par une hydrolyse douce, en milieu alcalin (WALEY et WATSON) (80) ou acide (DAUTREVAUX et BISERTE) (81). Finalement, la thiohydantoïne sera identifiée par chromatographie sur papier (DAUTREVAUX et BISERTE).

SCHEMA III

Formation de thiohydantoïne



2 - PARTIE EXPERIMENTALE

α) Méthode aux DNP-amino-acides de SANGER :

1- Dinitrophénylation : On effectue la dinitrophénylation des polypeptides selon la technique originale de SANGER (82) ; dans notre travail sur la polymyxine B, nous avons utilisé les conditions expérimentales suivantes :

50 ng de polymyxine B sont dissous dans 4 ml d'une solution aqueuse de bi-carbonate de sodium à 3 p.100. On ajoute une solution préparée extemporanément de 50 mg de DNFB dans 8 ml d'éthanol et le mélange est agité au moyen d'un agitateur magnétique pendant 3 heures à l'obscurité.

A la fin de la réaction, on acidifie par de l'acide sulfurique dilué et la DNP-polymyxine qui a précipité est isolée par centrifugation.

On élimine les sels minéraux et le DNFB en excès, en effectuant des lavages par centrifugation, d'abord à l'eau (une fois), puis à l'éthanol, jusqu'à ce que le liquide surnageant soit incolore, et enfin à l'éther.

2- Hydrolyse du DNP-peptide : Cette hydrolyse se fait dans des conditions identiques à celles des peptides, c'est-à-dire hydrolyse en tube scellé à 100°C, pendant 24 heures, par l'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé dans un appareil en verre (ROVERY et al.) (83).

Il faut signaler, toutefois, la fragilité des DNP-glycocolle, thréonine et proline à l'hydrolyse acide (PORTER et SANGER) (84). Dans ce cas, on effectue l'hydrolyse en tube scellé à 100°C, pendant 4 heures, par l'acide chlorhydrique 11,2 N redistillé dans un appareil en verre (ACHER et LAURILA) (85).

3- Isolément du DNP-amino-acide terminal : Le DNP-amino-acide terminal est séparé par extraction à l'éther de l'hydrolysate dilué quatre fois par de l'eau distillée dans une petite ampoule à décanter (*).

(*) Dans le cas des DNP-cystéine et méthionine, il est nécessaire d'utiliser un éther privé de peroxydes, par redistillation sur sulfate ferreux.

Une ou deux extractions suffisent, en général, à extraire la totalité des DNP-amino-acides terminaux (*).

L'extrait étheré contient, outre les DNP-amino-acides, du dinitrophénol (DNP-OH) qui se forme à la fois au cours de la dinitrophénylation et au cours de l'hydrolyse. Cet artéfact est éliminé par sublimation (MILLS) (86) : l'extrait étheré est évaporé à sec dans un petit ballon rond à col rodé extérieurement ; à ce rodage s'adapte un bouchon à double paroi, formant réfrigérant et muni d'une tubulure latérale reliée à une pompe à vide à palettes (Fig. 7). Le petit ballon est plongé dans un bain-marie à 70°C et le réservoir est garni d'un mélange réfrigérant qu'on change de temps à autre. La sublimation du DNP-OH est, en général, complète en 1 h.30 à 2 heures.

4- Identification des DNP-amino-acides : L'identification des DNP-amino-acides éthero-solubles se fait par chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° 1 à 20°C. La quantité de chaque DNP-amino-acide doit être inférieure à 30 µg.

En première dimension, on effectue une chromatographie ascendante dans le système de BISERTE et OSTÉUX (87) modifié par LEVY (88) :

| | |
|------------------------------|--------|
| - Toluène | 5 |
| - Pyridine | 1,5 |
| - Monochlorhydrine du glycol | 3 |
| - Ammoniaque 0,8 M | 3 (**) |

Le solvant est préparé 5 à 6 heures avant l'emploi. La chromatographie est réalisée dans une cuve en verre (30x30x60cm environ), fermée par une plaque de verre (Fig. 8). Dans le fond de la cuve, sont disposés, concentriquement, deux

(*) La DNP-arginine et l' α -DNP-histidine sont solubles dans l'eau et restent dans la phase aqueuse.

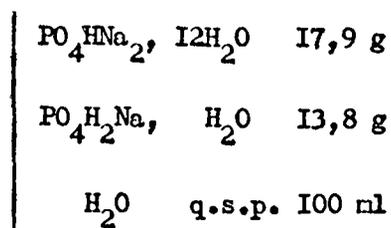
(**) Ammoniaque 0,8 M : ammoniaque à 22° B⁶ 57 ml
eau distillée q.s.p. 1 litre

crystallisoirs de taille différente : le cristallisoir central est garni d'ammoniaque 0,8 N ; la feuille à chromatographie, enroulée sous forme d'un cylindre, est placée dans l'espace annulaire, deux heures au moins avant la mise en route de la chromatographie ; à ce moment, la phase supérieure du solvant est filtrée et versée rapidement dans l'espace annulaire, au moyen d'un entonnoir à longue tubulure. La chromatographie est effectuée à l'obscurité, à une température de 20°C et pendant une durée de 15 heures.

Pour obtenir une bonne résolution chromatographique des DNP-amino-acides par cette technique, il est nécessaire de disposer d'une cuve parfaitement étanche, constamment saturée en ammoniaque 0,8 N et en solvant.

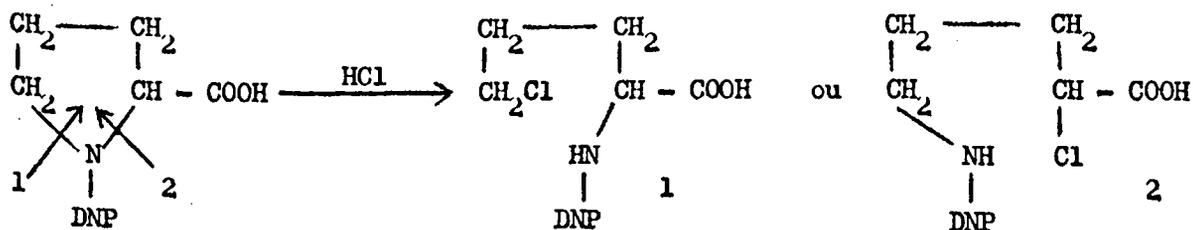
Après chromatographie dans ce système solvant, les feuilles sont séchées à l'obscurité, sous courant d'air chaud, pendant 24 heures.

On effectue alors une seconde chromatographie, descendante cette fois, à 20°C, pendant 9 heures, dans un tampon phosphate 1,5 M de pH 6.



Sur les chromatogrammes effectués dans ces conditions, la répartition des DNP-amino-acides se fait comme dans la Fig. 9 (*).

(*) La DNP-proline donne lieu, à l'hydrolyse acide, à la formation d'artéfacts qui en rendent l'identification délicate. Sous l'action des agents hydrolytiques, il y aurait ouverture du cycle pyrrolidine et formation d'acide δ-chloro-α-DNP-amino-valérique et d'acide α-chloro-δ-DNP-amino-valérique :



(SAUTIERE : expériences non publiées) (Voir Fig. 10).

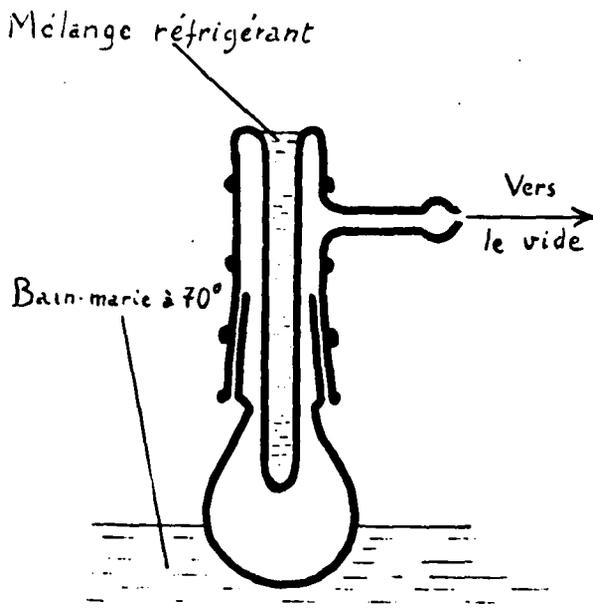


Figure 7

Schéma de l'appareil utilisé pour l'élimination du 2,4-dinitrophénol (HOLLEMAN)

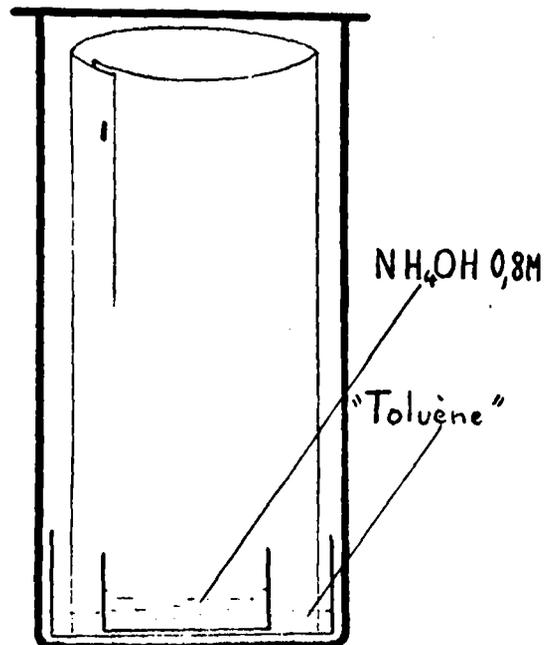


Figure 8

Schéma d'une cuve à chromatographie ascendante des DNP-acides dans le système "toluène" de LEVY

Réservoir central : NH_4OH 0,8 N.
Réservoir annulaire : phase supérieure du système.

| | |
|------------------------------|----|
| Toluène | 30 |
| Monochlorhydrine du glycol | 18 |
| Pyridine | 9 |
| NH_4OH 0,8 N | 18 |

La feuille de papier chromatographique (Whatman n°1) enroulée sous forme d'un cylindre, plonge dans le solvant de l'espace annulaire (point de départ à 4 cm minimum de la surface du solvant).



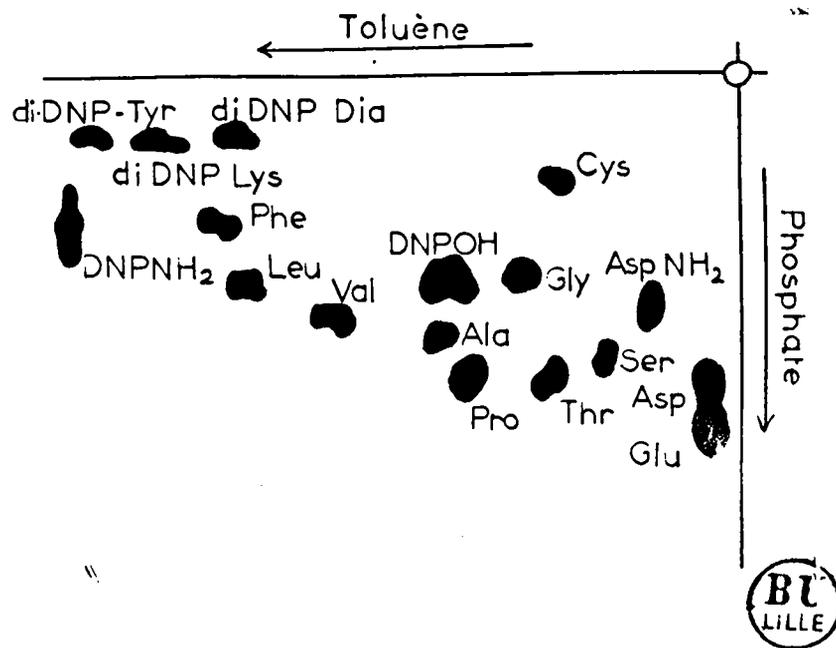


Figure 9

Schéma de chromatogramme bidimensionnel des dinitrophényl-amino-acides dans les solvants de LEVY

1ère dimension : toluène-Monochlorhydrine du glycol-Pyridine-NH₄OH 0,8 N
(5 : 3 : 1,5 : 3)

2ème dimension : tampon phosphate de sodium 1,5 M de pH 6.

DNP-OH = 2,4 dinitrophénol

DNP-NH₂ = 2,4 dinitraniline

Di-DNP-Lys = di-DNP-lysine

Di-DNP-Tyr = di-DNP-O,N-Tyrosine

Di-DNP-Dia = Acide di-DNP-aminobutyrique

Les autres dérivés dinitrophénylés sont notés sur le schéma comme les acides aminés correspondants (Ex : Asp-NH₂ - DNP-Asparagine)

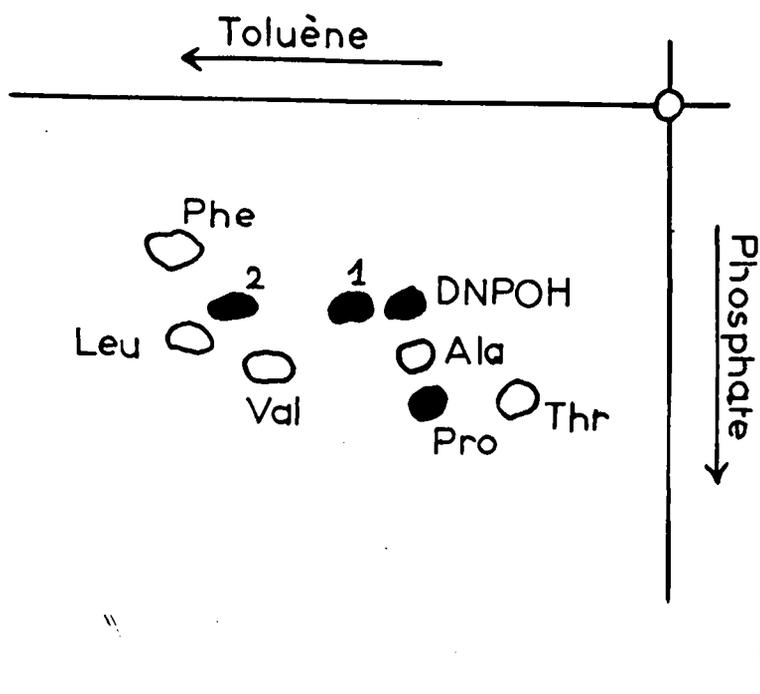


Figure 10

Etude des produits de décomposition de la DNP-proline à l'hydrolyse acide
(HCl 5,6 N à 100-105°C pendant 24 h. en tube scellé)

Schéma de chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes solvants de
LEVY

Sur le schéma, les dinitrophényl-amino-acides sont notés comme les acides
aminés correspondants (Ex : Ala = DNP-Alanine)

En noir, la DNP-proline et les produits de décomposition de la DNP-proline :
DNP-OH (2,4-Dinitrophénol)

I et 2 : taches correspondant à l'acide δ -chloro- α -DNP-amino-
valérique et à l'acide δ -DNP-amino- α -chloro-valérique.

En blanc : DNP-amino-acides de référence.

Le repérage des taches DNP-amino-acides est facile, grâce à la coloration jaune de ces substances. On peut augmenter la sensibilité du repérage, en effectuant celui-ci en lumière de WOOD : les DNP-amino-acides se présentent alors sous forme de taches de colorations variant du brun au violet.

β) Méthode des thiohydantoïnes

La réaction de condensation est effectuée sur le peptide acétylé.

L'acétylation de la polymyxine a été effectuée dans les conditions suivantes :

50 mg de sulfate de polymyxine B sont dissous dans 4 ml de NaOH N ; à cette solution sont ajoutés, alternativement et par petites portions, 1 ml d'anhydride acétique et 5 ml de NaOH 2 N. Il se forme un précipité qu'on isole par centrifugation et qu'on lave à l'eau distillée.

La polymyxine acétylée est mise en solution dans 5 ml de méthanol et la solution obtenue est déposée régulièrement sur toute la surface d'une feuille de papier Whatman n° I (12 cm x 28 cm) (FRAENKEL-CONRAT) (89). Après séchage à l'air libre, cette feuille est découpée en bandelettes de 2 x 4 cm qu'on enfile sur la tige d'un petit agitateur effilé. Ces bandelettes sont alors imprégnées d'une solution contenant :

| | |
|-------------------------------------|--------|
| SCNNH ₄ | 100 mg |
| CH ₃ COOH | 1 ml |
| (CH ₃ CO) ₂ O | 9 ml |

Elles sont ensuite enfermées dans un récipient étanche en verre et placées pendant 24 à 36 heures à l'étuve à 37°C. Après séchage, lavage soigneux au benzène contenant 5 p.100 de pyridine, puis à l'éthanol, et nouveau séchage, les bandelettes sont imprégnées de HCl N / I et l'on remet en vase clos à l'étuve à 37°C, pendant 36 heures. On sèche par un courant d'air chaud et l'on extrait les thiohydantoïnes par un mélange à parties égales d'éthanol et d'éther. Après évaporation du solvant, les

thiohydantoïnes sont identifiées par chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° I dans les systèmes DAUTREVAUX et BISERTE (90).

1ère dimension : alcool isoamylique saturé d'eau (15 h. à 20 °C) ;

2ème dimension : benzène/acide acétique/eau (1:1:1) (5 à 6 h. à 20°C, développement de 30 cm au moins).

La révélation se fait :

- 1- par l'observation en lumière de WOOD (fluorescence brune pour la tyrosine et le tryptophanne) ;
- 2- par le réactif phosphotungstique de FOLIN et DENIS et les vapeurs d'ammoniaque (taches bleues pour la plupart des thiohydantoïnes, vertes pour la tyrosine et le tryptophanne) ;
- 3- par le réactif de GROTE (91) : ce réactif est constitué par le mélange à parties égales, effectué extemporanément, de :

| | |
|--|-------|
| I - Nitroprussiate de sodium | 0,5 g |
| Chlorhydrate d'hydroxylamine | 0,5 g |
| " " | |
| Bicarbonate de sodium | 1 g |
| Eau distillée | 10 ml |

Après dissolution, on ajoute II gouttes de Brome ; on enlève l'excès de brome par barbotage d'air, on filtre et on dilue à 25 ml.

II - Solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium.

Après pulvérisation du réactif et exposition du chromatogramme à la vapeur d'un bain-marie bouillant, les thiohydantoïnes apparaissent sous forme de taches dont les colorations variées se modifient en fonction du temps.

Le Tableau VII et la Fig. II ci-après résument les résultats obtenus.

3 - ACIDES AMINES TERMINAUX DES POLYMYXINES

Nous avons appliqué à la détermination des extrémités N-terminales de la polymyxine B la méthode aux DNP-amino-acides de SANGER.

TABLEAU VII

R_F et colorations des thiohydantoïnes

| | R_F dans l'alcool isoamylique | R_F dans le benzène acide acétique | Colorations avec le réactif de GROTE |
|------------------|---------------------------------------|--|---|
| Glycocolle | 0,35 | 0,04 | Violet brun |
| Alanine | 0,62 | 0,18 | Bleu virant au violet |
| Valine | 0,87 | 0,60 | Bleu |
| Leucine | 0,87 | 0,76 | Bleu |
| Méthionine | 0,83 | 0,58 | Violet |
| Tyrosine | 0,75 | 0,00 | Orangé virant au jaune |
| Acide aspartique | 0,00 | 0,00 | Bleu virant au violet |
| Asparagine | 0,10 | 0,00 | Bleu virant au violet |
| Acide glutamique | 0,25 | 0,00 | Violet |
| Tryptophanne | 0,87 | 0,80 | Vert jaune virant au jaune sale |
| Lysine | 0,87 | 0,16 | Bleu |
| Thréonine | 0,78 | 0,38 | Vert virant au violet |
| Phénylalanine | 0,86 | 0,70 | Brun violet virant au beige |
| Histidine | 0,20 | 0,00 | Violet |

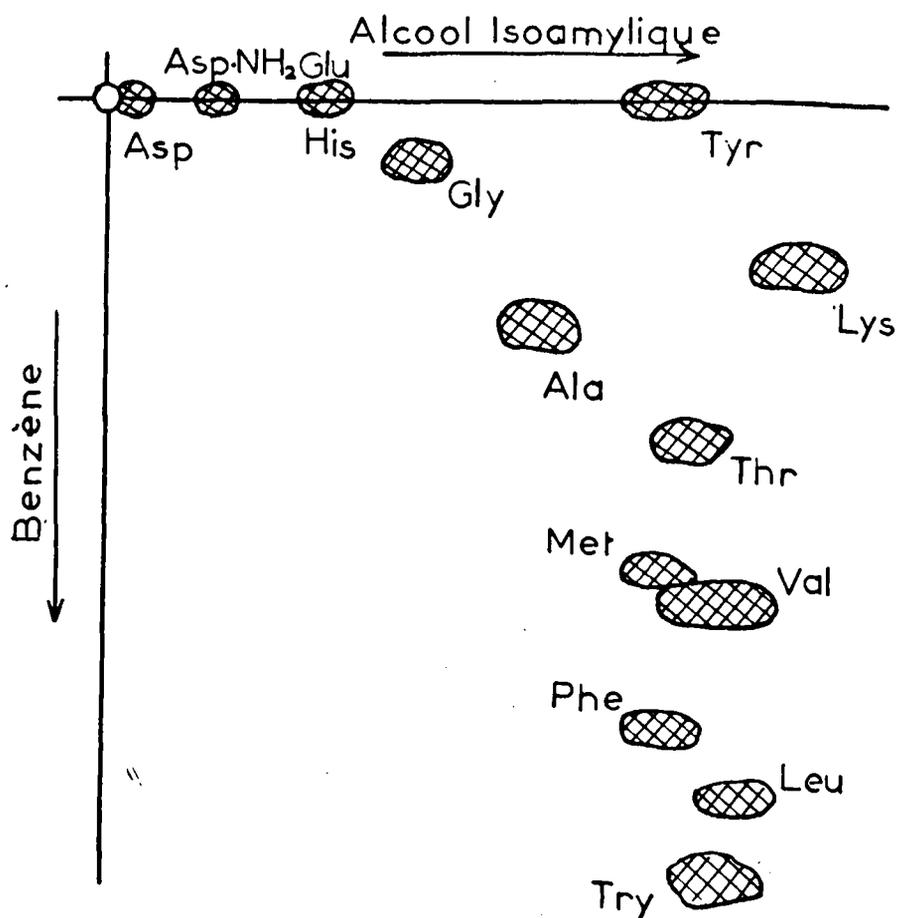


Figure II



Schéma de chromatogramme bidimensionnel des 2-thiohydantoïnes

1ère dimension : alcool isoamylique saturé d'eau

2ème dimension : benzène/acide acétique/eau (1 : 1 : 1)

Les thiohydantoïnes sont notées sur ce schéma comme les acides aminés correspondants (Ala = 5-méthyl-2-thiohydantoïne)

La polymyxine B est totalement dinitrophénylée dans les conditions habituelles (voir plus haut). La DNP-polymyxine obtenue, insoluble dans l'eau, est isolée par centrifugation du milieu réactionnel et lavage du culot à l'eau, à l'éthanol et à l'éther.

Après hydrolyse totale de la DNP-polymyxine, l'hydrolysats est extrait deux fois à l'éther.

L'extrait étheré, étudié par chromatographie bidimensionnelle sur papier (Voir plus haut), ne nous a révélé la présence d'aucun DNP-amino-acide.

Le résidu aqueux a été étudié par chromatographie bidimensionnelle dans les solvants butanol/acide acétique et phénol (3 p.100 d'ammoniaque). Les chromatogrammes obtenus montrent la présence, avant révélation, d'une tache jaune virant au brun, par réaction avec la ninhydrine : il s'agit de l'acide γ -DNP-diaminobutyrique ; on note aussi l'apparition de la thréonine, de la leucine, de la phénylalanine et de l'acide α, γ -diaminobutyrique. Cet acide α, γ -diaminobutyrique libre ne disparaît pas après incubation de l'hydrolysats avec la D-acidamino-déshydrogénase : il s'agit donc de l'acide L- α, γ -diaminobutyrique.

L'application de la méthode des thiohydantoïnes à la polymyxine B ne nous a pas permis non plus de déceler une extrémité C-terminale.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par HAUSMANN (92).

De ces constatations, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- 1 - la polymyxine B ne possède ni extrémité N-terminale, ni extrémité C-terminale : on peut donc lui assigner une structure cyclopeptidique.
- 2 - l'hydrolyse de la DNP-polymyxine B libère de l'acide α, γ -diaminobutyrique libre ; cet acide aminé ne peut provenir de l'hydrolyse de l'acide γ -DNP-diaminobutyrique car l'hydrolyse acide des DNP-amino-acides donne lieu à la formation d'un acide-alcool et de dinitraniline. Le groupement γ -NH₂ de l'un des acides L- α, γ -diaminobutyrique n'est donc pas substituable par le DNFB et nous avons émis l'hypothèse que, dans la polymyxine B, cette fonction était amidifiée par la fonction

carboxylique de l'acide gras. Nous verrons qu'il n'en est rien, puisque en réalité, l'acide gras est supporté par l'acide D- α , γ -diaminobutyrique (Voir plus loin)

Des résultats analogues ont été obtenus par BELL pour la polynyxine D : cet auteur émet l'hypothèse d'une structure cyclopeptidique (93).

B - ETUDE DE L'ENCHAINEMENT PEPTIDIQUE

L'étude d'une séquence peptidique est effectuée par des simplifications progressives du substrat en fragments plus petits. Ces fragments peptidiques sont séparés par des techniques appropriées de fractionnement ; ils sont ensuite soit simplifiés à nouveau, soit étudiés directement.

Schématiquement, le peptide A-B-C-D-E-F sera soumis à une hydrolyse partielle qui libèrera des acides aminés (A, B, C,...) des dipeptides (A-B, B-C, C-D...), des tripeptides (A-B-C, B-C-D,...), des tétrapeptides, etc... Après fractionnement du mélange peptidique obtenu, chaque peptide isolé sera étudié du point de vue de sa composition et de ses acides aminés terminaux. On obtiendra, par exemple :

- 1 - A-(B,C) (*)
- 2 - B-C
- 3 - (C,D,E)-F
- 4 - (D,E)-F
- 5 - F-G
- 6 - E-(F,G)

A-B-C-D-E-F-G

L'assemblage des différentes séquences partielles obtenues, permet alors d'établir l'enchaînement peptidique du substrat.

(*) Nous utilisons les notations de SANGER (94). Par convention, les amino-acides sont écrits dans l'ordre de leur enchaînement, en commençant par leur extrémité N-terminale ; si la séquence exacte est connue, ils sont séparés les uns des autres par un tiret ; sinon, ils sont séparés par une virgule et la zone correspondante dans la chaîne peptidique est isolée entre des parenthèses.

I - HYDROLYSE PARTIELLE DES POLYPEPTIDES

L'hydrolyse partielle des polypeptides et des protéines peut être réalisée de deux manières : soit par l'action ménagée des acides, soit par l'action des protéinases.

a) Principe des méthodes

α) Hydrolyse partielle acide : On pourra opérer dans des conditions identiques à celles de l'hydrolyse totale, mais en modifiant un ou plusieurs facteurs de l'hydrolyse, comme la température, la "force" de l'acide ou la durée de l'hydrolyse. Comme l'obtention d'un nombre relativement faible de peptides différents est recherchée, on aura intérêt à effectuer l'hydrolyse à la plus faible vitesse possible, de façon à pouvoir déterminer la durée d'hydrolyse la plus favorable.

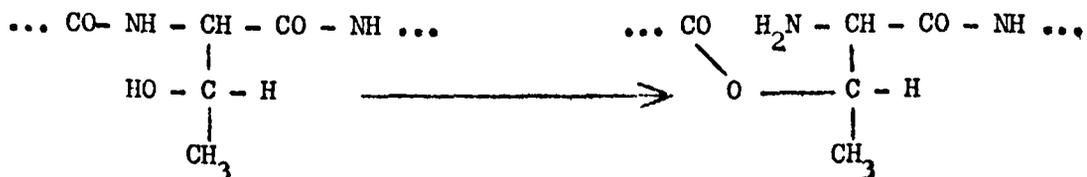
Les principaux reproches qu'on puisse formuler contre ce type d'hydrolyse sont de deux ordres : tout d'abord, au cours de cette opération, il se forme un très grand nombre de petits peptides (di, tri- ou tétrapeptides), ce qui est très défavorable à l'étude de la séquence des polypeptides de poids moléculaire élevé ; en second lieu, l'hydrolyse acide n'est pas suffisamment sélective. On pourra, certes, noter la résistance relative des liaisons peptidiques auxquelles la leucine ou la valine participent par leur fonction α -aminée (SYNGE) (95) ; on pourra de même noter au contraire, la fragilité des liaisons N-thréonine et N-sérine (DESNUELLE et CASAL) (96).

Au cours de cette action de l'acide, la nature des liaisons peptidiques semble conditionner, dans une certaine mesure, leur rupture ; leur position dans la chaîne peptidique a, au contraire, peu d'importance, ce qui se conçoit aisément, si on considère les faibles dimensions de l'ion H^+ , capable d'aborder facilement tous les points de la chaîne peptidique.

On peut, cependant, signaler deux méthodes d'hydrolyse acide préférentielle :

- 1- Hydrolyse ménagée par les acides dilués (HCl $\frac{N}{10}$, $SO_4H_2 \frac{N}{10}$) qui permet la libération préférentielle de l'acide aspartique (PARTRIDGE) (97).
- 2- Hydrolyse préférentielle de DESNUELLE et BONJOUR (98). Cette technique exploite la particulière fragilité des liaisons N-thréonine et N-sérine à l'hydrolyse acide.

Par traitement à l'acide sulfurique concentré, la liaison CO-NH-thréonine est transposée en une liaison ester -CO-O-thréonine, suivant la réaction suivante :



Une hydrolyse acide dans des conditions particulièrement douces, permet l'hydrolyse spécifique de la liaison C - O.

β) Hydrolyse enzymatique : L'hydrolyse enzymatique présente à la fois une spécificité de nature et de position vis-à-vis de la liaison peptidique : elle sera donc toujours plus favorable que l'hydrolyse acide, car elle libèrera un plus petit nombre de peptides différents, ce qui simplifiera énormément le fractionnement ultérieur ; chaque peptide libéré sera, d'autre part, quantitativement plus important, ce qui permettra une étude avec un matériel plus abondant.

Les enzymes employés sont la pepsine, qui agit à un pH optimum de 1,8, la trypsine et la chymotrypsine qui agissent à un pH de 9, et la subtilisine qui agit à pH 6,3.

L'action de la pepsine porte principalement sur les liaisons peptidiques impliquant le groupement $\alpha\text{-NH}_2$ de la tyrosine, de la phénylalanine, de la leucine et de la valine (SANGER et TUPPY) (99).

La trypsine agit sur les liaisons dans lesquelles la lysine et l'arginine se trouvent engagées par leur COOH (BERGMANN et ROSS) (100).

La chymotrypsine est spécifique des liaisons où la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et la méthionine sont engagés par leur COOH (BERGMANN et FRUTON) (101).

b) Application expérimentale à la polymyxine B

Les enzymes protéolytiques se sont révélés absolument inactifs vis-à-vis de la polymyxine B ; on verra d'ailleurs qu'on ne retrouve dans la polymyxine aucune des spécificités d'action de la pepsine, de la trypsine ou de la chymotrypsine. Par contre, la polymyxine B est caractérisée par une sensibilité particulière à l'action des agents hydrolytiques acides. Nous avons essayé trois types d'hydrolyse acide :

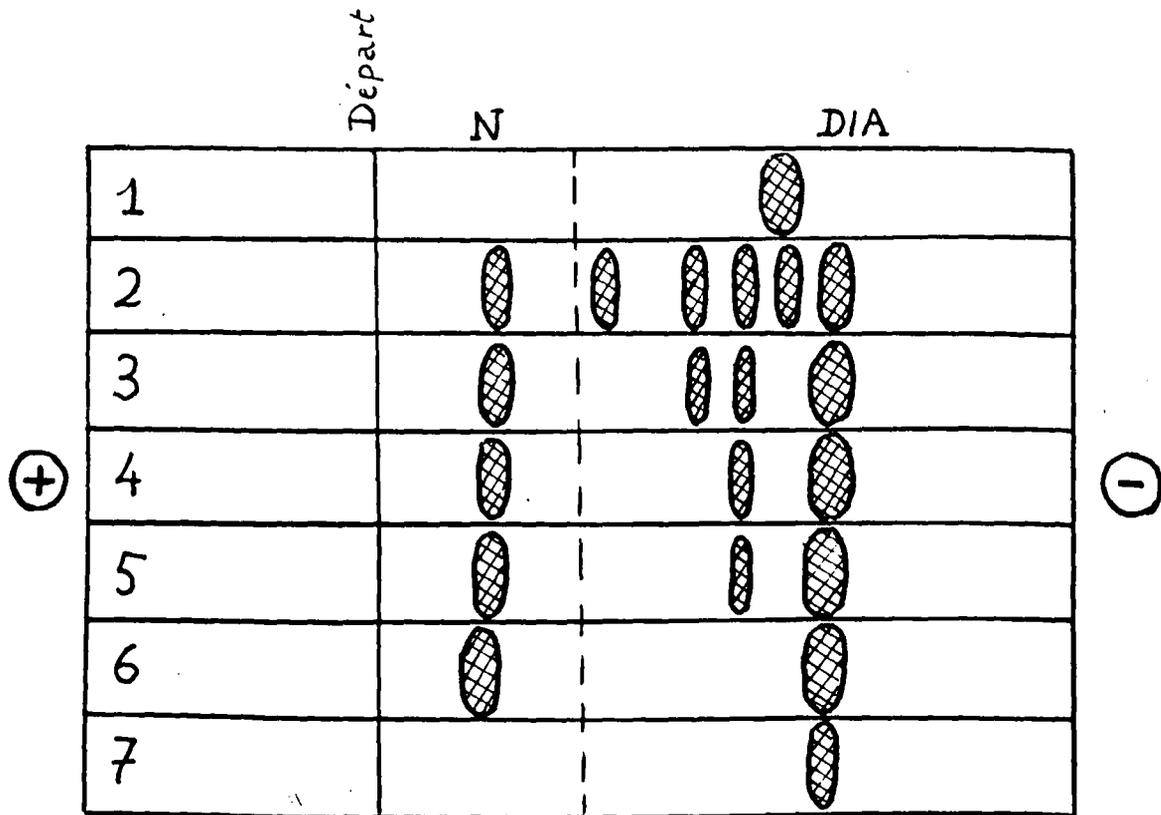
a) Hydrolyse acide à reflux par HCl 5,6 N : La polymyxine (10 mg) dissoute dans 10 ml de HCl 5,6 N est portée à l'ébullition sous réfrigérant à reflux ; des prélèvements de 1 ml sont effectués toutes les trente minutes.

Ces hydrolysats, après dilution à l'eau distillée, sont dessalés par passage sur micro-colonne d'Amberlite IR I20. Les colonnes sont éluées par l'ammoniaque 2 N ; les éluats, après évaporation à sec, sont repris dans 0,1 ml d'eau distillée et étudiés en électrophorèse (10 μ l) à pH 3,9 (Fig. I2).

Ce type d'hydrolyse est trop brutal pour pouvoir être appliqué à l'étude de la polymyxine ; en effet, la polymyxine est pratiquement hydrolysée totalement en 2 h.30 ; déjà, en 30 minutes, la proportion des fractions électrophorétiques correspondant à des peptides est faible par rapport à celles constituées par des amino-acides libres (N et B).

β) Hydrolyse à 37°C pendant des temps courts : Les conditions d'hydrolyse sont les suivantes :

50 mg de polymyxine B sont dissous dans 5 ml de HCl 11,2 N et la solution obtenue est portée à l'étuve à 37°C. Des prélèvements de 1 ml effectués au bout de temps



BU
LILLE

Figure I2

Etude de l'hydrolyse partielle de la polymyxine B par l'acide chlorhydrique 5,6 N à l'ébullition

Schéma d'électrophorèse à pH 3,9 des produits d'hydrolyse (130 volts, 20 mA, 9 h)

N = acides aminés et peptides neutres
Dia = acide α, γ -diaminobutyrique

- 1) Témoin polymyxine B avant hydrolyse
- 2) Hydrolyse de 30 minutes
- 3) Hydrolyse de 1 h.
- 4) Hydrolyse de 1 h.30
- 5) Hydrolyse de 2 h.
- 6) Hydrolyse de 2 h.30
- 7) Témoin acide α, γ -diaminobutyrique

déterminés sont alors dilués avec 4 ml d'eau distillée et évaporés à sec, sous pression réduite. Le résidu sec est repris dans 0,5 ml d'eau distillée et étudié en électrophorèse (10 μ l) à pH 3,9 (Fig. 13).

L'étude de l'hydrolysats pendant 1 heure est intéressante : si les fractions basiques sont quasiment inséparables par chromatographie sur papier, la fraction neutre se révèle, par contre, extrêmement homogène et ne donne qu'une seule tache par chromatographie bidimensionnelle. Après hydrolyse, on ne peut identifier que l'acide α, γ -diaminobutyrique. Nous retrouverons ce composé neutre en électrophorèse au cours d'autres fractionnements ; nous verrons qu'il est constitué par l'amide de l'acide gras et de l'acide D-diaminobutyrique. Il est cependant intéressant de signaler, dès à présent, que ce composé et, en général, tous les composés du même genre comprenant l'acide gras, ne se retrouvent que dans les hydrolysats à 37°C. Le composé est, d'autre part, l'un des premiers à être libérés au cours de l'hydrolyse acide.

γ) Hydrolyse à 37°C pendant des temps longs : L'hydrolyse partielle est effectuée sur 200 mg de polymyxine B par 20 ml de HCl 11,2 N à 37°C (pendant 6 jours). A la fin de l'hydrolyse, l'acide chlorhydrique est soigneusement éliminé par évaporation sous pression réduite.

La chromatographie bidimensionnelle et l'électrochromatographie d'une partie aliquote de l'hydrolysats présentent les aspects suivants reproduits dans les Fig. 14 et 15.

δ) Hydrolyse préférentielle de la liaison thréonine : La polymyxine B contenant dans sa molécule deux résidus de thréonine, il était intéressant d'étudier la constitution des peptides libérés dans ce type d'hydrolyse spécifique.

50 mg de polymyxine B sont mis en suspension dans 2 ml d'éthanol absolu ; à ce mélange préalablement refroidi à -20°C, on ajoute alors, petit à petit, 20 ml

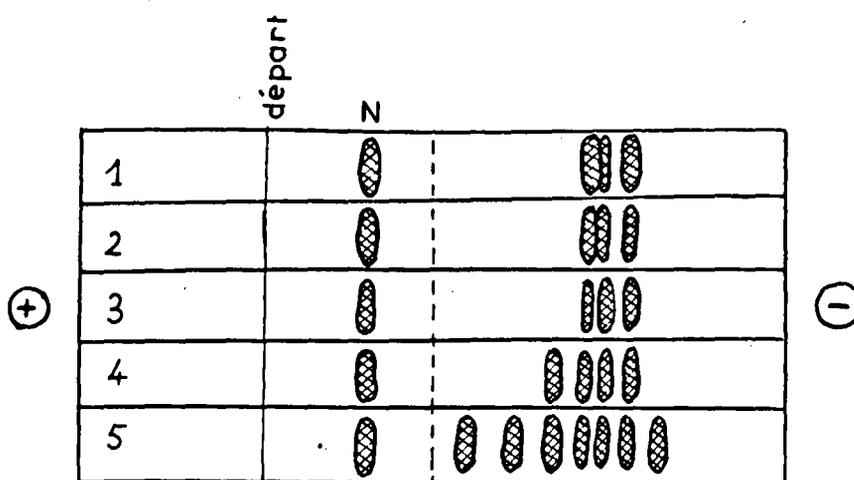


Figure I3

Etude de l'hydrolyse de la polymyxine B pendant des temps courts
(HCl II,2 N à 37°C - hydrolyse de I à 24 h.)

Schéma d'électrophorèse à pH 3,9 (130 volts, 30 mA, 9 h.) des
produits d'hydrolyse de la polymyxine après des temps

- de 1 h. sur la bande n° 1
- 2 h. sur la bande n° 2
- 5 h. sur la bande n° 3
- 8 h. sur la bande n° 4
- 24 h. sur la bande n° 5

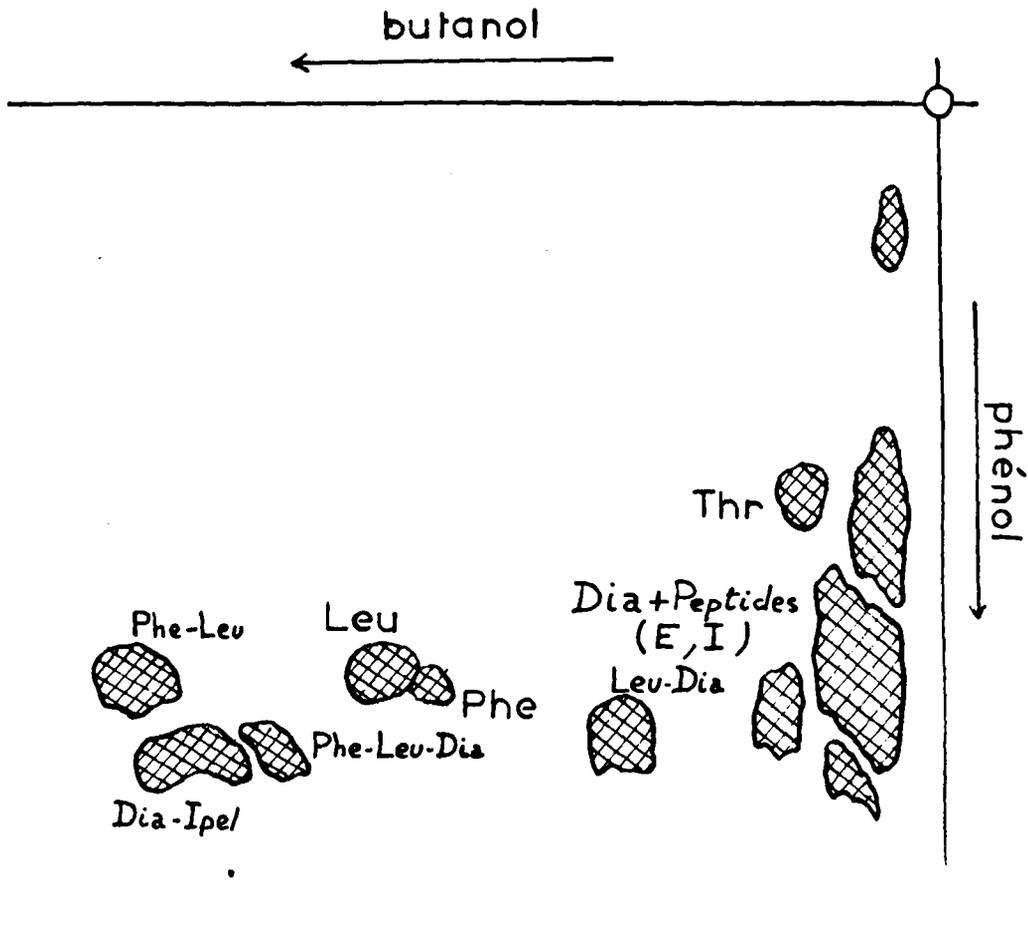


Figure I4

Etude de l'hydrolyse partielle de la polynyxine B par l'acide chlorhydrique $11,2 \text{ N}$ pendant 6 jours à 37°C

Schéma du chromatogramme bidimensionnel des produits d'hydrolyse :

1ère dimension : butanol/acide acétique/eau (4:1:5)

2ème dimension : phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale 3 p.100 et en présence de HCN.

Abréviations (Voir Figure n° 6)

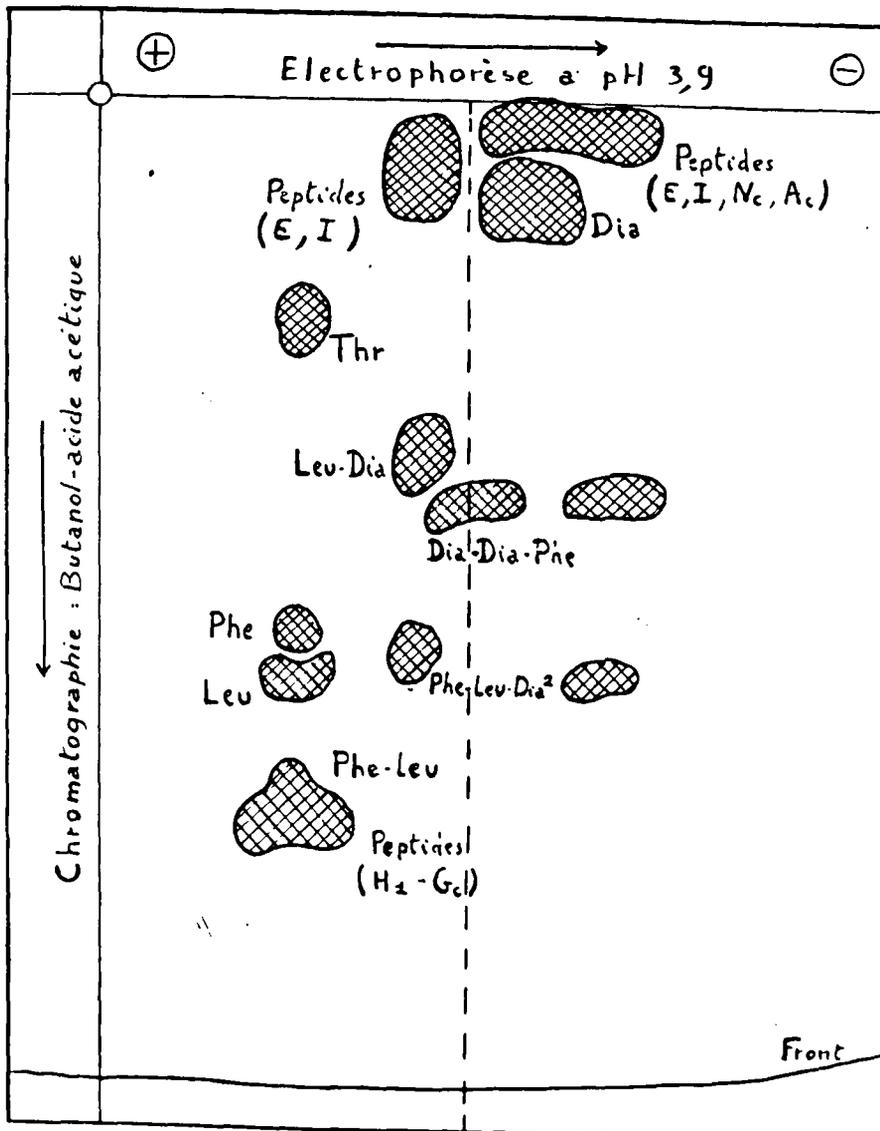


Figure 15



Etude de l'hydrolyse partielle de la polymyxine B par l'acide chlorhydrique II,2 N pendant 6 jours à 37°C

Schéma d'électrochromatogramme des produits d'hydrolyse

1ère dimension : électrophorèse à pH 3,9 (120 volts, 24 h.) tampon pyridino/acide acétique/eau (30:100:4870)

2ème dimension : chromatographie dans le système butanol/acide acétique/eau (4:1:5)

d'acide sulfurique concentré également refroidi à -20°C . La température tendant à s'élever au fur et à mesure de l'addition de l'acide, le mélange est refroidi continuellement. Une fois l'addition de l'acide terminée, la polymyxine se trouve complètement dissoute ; la solution est alors laissée à température ambiante pendant huit jours, en évitant toute trace d'humidité. Au bout de ce temps, la solution acide est versée dans un grand volume d'éther anhydre redistillé sur sodium, et la poudre blanche qui précipite est recueillie et lavée à l'éther par centrifugation. Le précipité est constitué de la polymyxine B ayant subi la transposition $\text{C-N} \rightarrow \text{C-O}$.

L'hydrolyse partielle est alors effectuée par l'acide chlorhydrique 5,6 N à $+ 20^{\circ}\text{C}$ pendant 4 à 5 heures.

L'étude électrophorétique d'un tel hydrolysats partiel ne montre la présence que de deux fractions, une fraction neutre et une fraction basique.

La fraction basique est hétérogène et non fractionnable par électrophorèse ou chromatographie sur papier ; elle semble constituée d'au moins deux gros peptides.

Nous n'avons pas poursuivi l'étude de tels hydrolysats ; comme on le verra plus loin, ceux-ci ne peuvent apporter aucune précision supplémentaire sur la structure de la polymyxine B.

2 - FRACTIONNEMENT DES PEPTIDES D'UN HYDROLYSAT PARTIEL

Le fractionnement des peptides est le problème le plus important et le plus délicat à résoudre de tous ceux qui se posent lors de la détermination des séquences peptidiques. Ce problème est tout d'abord fonction de la complexité du mélange de peptides ; un mélange simple ne nécessitera souvent que l'application d'une seule technique de fractionnement, mais, dans le cas plus général d'un mélange complexe provenant d'un hydrolysats partiel, il faudra avoir recours à l'emploi de plusieurs techniques successives de séparation. La nature, la longueur des peptides interviennent aussi dans le choix des techniques.

Les différentes techniques de fractionnement peuvent être classées en techniques primaires, d'application très générale, et en techniques secondaires, dont les applications sont limitées, soit par la taille, soit surtout par la nature des peptides soumis au fractionnement.

a) Principe des méthodes de fractionnement

a) Techniques primaires : Ces techniques primaires sont :

- la chromatographie de partage,
- l'électrophorèse,
- la distribution à contre-courant,
- l'échange d'ions.

1- La chromatographie de partage : Le principe de cette méthode de fractionnement est maintenant classique ; nous en avons vu les modalités d'application dans l'identification des acides aminés. La chromatographie de partage sur papier peut être utilisée pour le fractionnement des peptides mais l'application en est un peu plus délicate. Il faut tout d'abord signaler une plus faible sensibilité des peptides à la révélation à la ninhydrine, ce qui nécessite l'emploi de quantités plus importantes du mélange à séparer. De plus, la résolution d'un mélange de gros peptides est beaucoup moins bonne.

Ainsi, en chromatographie unidimensionnelle sur papier, il est fréquent d'observer des effets de traînées de la part des gros peptides : ceux-ci restent, en effet, rassemblés aux environs du point de départ et, seuls, les plus petits peptides donnent des taches bien isolées. En chromatographie bidimensionnelle, la résolution est plus satisfaisante et les peptides donnent lieu à des spots assez larges, mais assez souvent, les gros peptides se rassemblent en plages diffuses, difficiles à délimiter.

Un problème, qui se pose avec une acuité particulière, est celui de l'homogénéité des fractions récupérées en chromatographie sur papier ; il arrive fréquemment qu'une fraction soit homogène dans un solvant et ne révèle son hétérogénéité que dans un autre solvant ou dans un autre système de fractionnement d'un principe nettement différent. C'est pourquoi il est rarement possible d'effectuer la séparation d'un mélange complexe de peptides au moyen d'une seule technique de fractionnement. Il arrive aussi qu'une fraction apparaisse hétérogène dans un solvant chromatographique alors qu'elle a été récupérée après chromatographie séparative dans le même solvant.

2- Electrophorèse sur papier : Les différences entre les vitesses de migration dans un champ électrique sont couramment utilisées pour séparer les substances polaires. Les acides aminés et les peptides peuvent ainsi être séparés par électrophorèse sur papier (WIELAND) (I02) (DURRUM) (I03) (BISERTE) (I04).

Cette technique de fractionnement ne permet pas la séparation parfaite de tous les peptides d'un hydrolysât : ceux-ci sont, en général, séparés en un nombre très limité de fractions hétérogènes, qu'il sera nécessaire de fractionner à nouveau, suivant une technique différente.

La technique du fractionnement électrophorétique constitue donc, surtout, une méthode de base, destinée à simplifier un mélange complexe de peptides.

3- Distribution à contre-courant : Cette méthode repose sur les différences entre les coefficients de partage des divers constituants d'une série chimique entre deux solvants peu ou pas miscibles.

L'appareillage automatique nécessité par cette technique est malheureusement complexe (CRAIG) (I05). Il comprend un nombre plus ou moins grand de cellules contenant un volume donné de la phase la plus dense du solvant, qui est équilibré

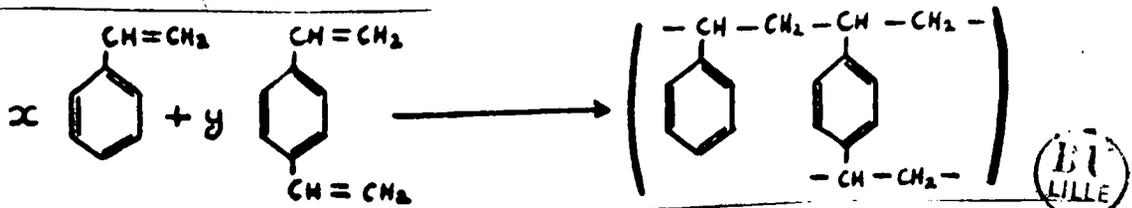
par des temps d'agitation et de décantation successifs, avec la phase la moins dense ; cette phase provient d'une opération identique effectuée dans la cellule immédiatement précédente. La dernière cellule décante la phase la moins dense dans un appareil collecteur de fraction.

4- Chromatographie sur résine à échange d'ions : L'échange d'ions est devenu une méthode de travail particulièrement efficace au même titre que la distillation, la filtration, la cristallisation et la chromatographie de partage.

Les échangeurs d'ions organiques synthétiques représentent, à l'heure actuelle, 80 à 90 p.100 des échangeurs en usage. Ils sont constitués par une macromolécule formant le support insoluble sur lequel sont fixés des radicaux polaires.

La macromolécule est préparée par polymérisation de monomères contenant une ou plusieurs liaisons conjuguées : le polymère le plus utilisé est le polystyrène.

La polymérisation du styrène s'effectue simplement au moyen d'un catalyseur d'oxydation (peroxydes organiques) suivant la réaction :



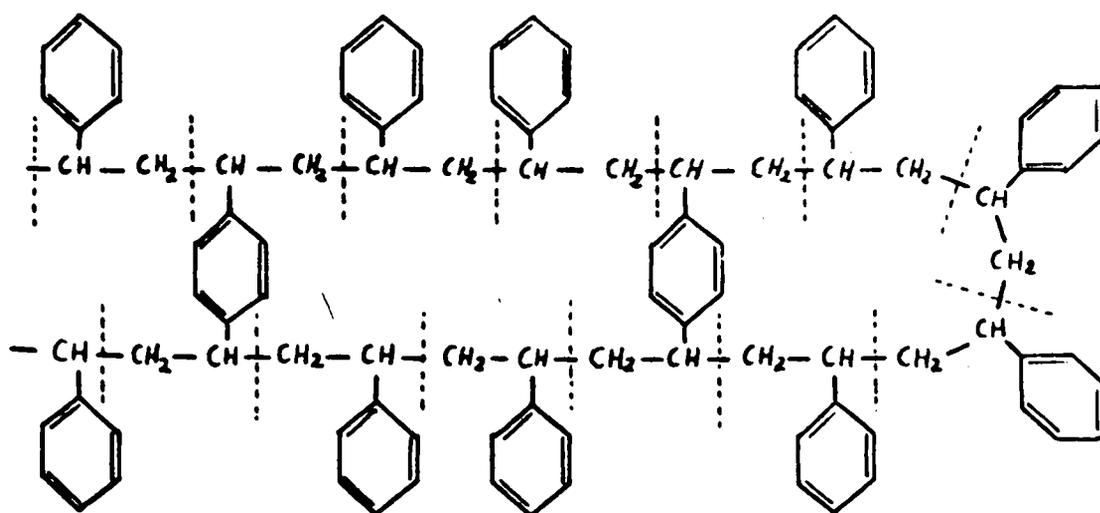
La chaîne linéaire obtenue, quand elle est substituée par des radicaux polaires, conduit à un composé soluble dans l'eau. Il n'en est plus de même si on a, au préalable, "réticulé" la chaîne polystyrène au moyen d'une substance réticulante, copolymérisable, qui sera, par exemple, le divinylbenzène (Schéma IV).

Le pourcentage de divinylbenzène ajouté déterminera la formation d'un plus ou moins grand nombre de liaisons croisées, donc un certain degré de réticulation.

Ce degré de réticulation influera directement sur les propriétés physiques du copolymère substitué : le gonflement dans l'eau, donc la porosité, par exemple, est d'autant plus faible que la réticulation est plus poussée.

SCHEMA IV

Polymérisation réticulento du styrène avec du divinylbenzène



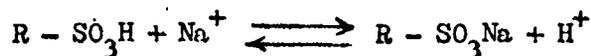
Sur ce support insoluble, sont fixés divers radicaux polaires, différents suivant le rôle que sera appelée à jouer la résine.

Dans le cas des résines à échanges d'anions, le radical polaire est, en général, un radical aminé. Les résines à échanges de cations possèdent, au contraire, un radical polaire acide : carboxylique pour les résines à échange de cations faiblement acides, sulfoné pour les résines fortement acides.

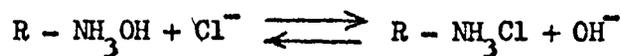
Fonctionnement des résines

a) Equilibre: Schématiquement, les résines à échange d'ions fonctionnent selon les réactions suivantes :

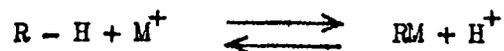
Résines à échange de cations :



Résines à échange d'anions :



La fixation des ions sur un échangeur est donc une réaction réversible. Pour une résine à échange de cations, la réaction pourra s'écrire :



d'où la constante d'équilibre :

$$K = \frac{a_{M^+}}{a_{H^+}} = \frac{C_{RM} \cdot \gamma_{H^+}}{C_{H^+} \cdot \gamma_{M^+}} \quad (1)$$

a_{M^+} et a_{H^+} étant l'activité des ions en présence, C leur concentration et γ leur coefficient d'activité.

Soit C_0 la concentration initiale en ion M^+ ; à l'équilibre $C_0 - C$ ions M^+ auront été échangés avec H^+ .

$$K = \frac{C}{C_0 - C} \cdot \frac{\gamma_{M^+}}{\gamma_{H^+}} \quad (2)$$

Le rapport $\frac{\alpha_{M^+}}{\alpha_{H^+}}$ est approximativement égal à l'unité et peut donc s'éliminer dans le cas d'échange entre ions de même valence.

$$K = \frac{C}{C_0 - C} = \frac{C/C_0}{1 - C/C_0} = \frac{a}{1 - a}$$

a représente le coefficient d'échange de M^+ vis-à-vis de H^+ .

b) Facteurs de l'équilibre :

1 - Influence des concentrations : D'après l'équation (I), on voit que si l'on augmente la proportion de l'un des ions dans la solution, l'équilibre évoluera dans le sens de la disparition de cet ion, c'est-à-dire dans le sens de la fixation de cet ion par la résine.

De même, si on élimine, par exemple, le composant M^+ du milieu réactionnel, l'équilibre évoluera dans le sens de la disparition de l'autre ion, par fixation sur la résine : c'est ce qui se passe dans l'emploi des colonnes, où le composant M^+ , élué par une solution de concentration définie en N^+ , est éliminé au bas de la colonne, au fur et à mesure de son élution : celle-ci sera donc totale.

2 - Influence de la température : D'après la loi de VAN t'HOFF

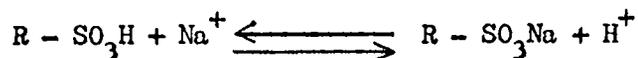
$$\frac{d \log K}{d T} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

si ΔH , la variation d'enthalpie, est positive (élution endothermique) $\frac{d \log K_p}{d T}$ sera, lui aussi, positif et K, la constante de l'équilibre, variera dans le même sens que la température.

Cette influence de la température sur la constante d'équilibre permettra, par exemple, l'élution de composés fortement adsorbés sur une résine en opérant à une température plus élevée.

3 - Influence du pH : Dans le fonctionnement des échangeurs, le pH joue son rôle de deux manières différentes.

Prenons le cas d'une résine sulfonée $R - SO_3H$:



Une diminution de pH dans la solution, provoquera donc l'augmentation des ions Na^+ dans la solution, donc l'éluion de la résion des ions Na^+ qui y étaient fixés.

Nous en verrons plus loin l'application dans la régénération des résines cationiques.

D'autre part, quand les substances en solution, en contact avec la résine sont des composés amphotères, leur ionisation s'effectue dans un sens ou dans l'autre, suivant le pH : vis-à-vis d'une résine à échange de cations, ces composés ne se trouvent à l'état de cations qu'en dessous de leur point isoélectrique : si donc on met en contact avec une résine à échange de cations, une solution alcaline de divers composés amphotères et qu'on diminue progressivement le pH, ces divers composés vont s'ioniser successivement et ontrer, de ce fait, en équilibre avec la résine. Inversement, nous en verrons l'application plus loin, on peut éluer sélectivement des composés amphotères fixés sur une résine à échange de cations, au moyen d'une solution ionique de pH croissant.

4 - Influence des caractéristiques de la résine :

- a) les radicaux polaires peuvent être différents, indépendamment de la distinction que nous avons faite entre les résines à échange d'anions et à échange de cations. Nous avons vu que, dans le premier type de résines, le radical polaire était un radical aminé. Dans le second type, ce radical est un radical acide ; ce peut être un radical carboxylique dans les résines faiblement acides, qui ne fonctionnent qu'à un pH alcalin compris entre 7 et 14 (ces résines se trouvent toujours sous leur forme $COOH$ en milieu acide) ; ce peut être aussi un radical sulfoné dans les résines fortement acides : ces résines peuvent alors fonctionner à toutes zones de pH (0 à 14).

Le choix de l'un de ces types de résine est, avant tout, fonction de la nature des peptides à séparer. Alors que les peptides acides (surtout les peptides à acide cystéique) seront séparés sur une résine à échange d'anions, les peptides neutres ou basiques seront séparés sur une résine à échange de cations fortement acide. Les protéines de faible poids moléculaire (ribonucléase) pourront être fractionnées sur une résine faiblement acide (Amberlite IRC 50) (HIRS, MOORE et STEIN) (106).

b) le pourcentage de liaisons croisées joue souvent un grand rôle.

La réticulation du polystyrène par le divinylbenzène a pour effet de provoquer une torsion des chaînes polystyrène, torsion d'autant plus importante qu'il y a plus de liaisons croisées : de ce fait, un certain nombre de radicaux polaires de la résine se trouvent inaccessibles par suite d'empêchements stériques, d'où diminution de la "capacité" de la résine. La réticulation a, d'autre part, pour effet de diminuer le gonflement de la résine dans l'eau, d'où diminution de la porosité : les molécules "encombrantes", comme les gros peptides ne pourront donc être fixés. Le choix d'une résine à pourcentage donné de liaisons croisées est donc important. La chromatographie des acides aminés requiert l'usage d'une résine à 8 p.100 de liaisons croisées ; la chromatographie des peptides, au contraire, nécessitera un compromis entre la sélectivité et la capacité (HIRS, MOORE et STEIN) (107).

c) Enfin, la dimension des grains de l'échangeur est très importante, car elle influe directement sur la vitesse d'écoulement de colonne ; nous avons toujours supposé, jusqu'ici, que l'équilibre entre substances dissoutes et substances fixées était réalisé en tout point de la colonne : en cas d'écoulement rapide, cet équilibre ne pourra être réalisé que pour les substances à fort coefficient d'échange. On peut ainsi faire jouer aux résines à gros grains le rôle d'un

"tamis moléculaire" : ainsi l'Amberlite IR I20 pulvérisée en grains de 0,3 à 0,5 mm de diamètre, fixe les acides aminés et peptides, mais est incapable de retenir les gros polypeptides et les protéines (PARTRIDGE) (108).

Inversement, l'emploi d'une résine à grains fins (300 à 400) sera peut-être favorable au bon fonctionnement de la résine, mais la lenteur excessive de l'écoulement sera souvent néfaste à cause des diffusions qui pourront se produire. Enfin, l'emploi d'une résine hétérogène quant à la taille des différents grains, conduit à des distorsions et à des irrégularités au cours de la chromatographie sur échangeurs d'ions.

Application des résines à échange d'ions

Les résines à échange d'ions permettent de résoudre un certain nombre de problèmes, principalement celui du fractionnement de peptides ou d'acides aminés. Elles sont également très précieuses pour la déminéralisation ou dessalage de liquides biologiques et des hydrolysats protéiques.

1) Dessalage d'une solution d'acides aminés ou de peptides : Cette solution peut consister, par exemple, en un liquide biologique contenant, en solution, outre des substances organiques polaires, comme des amino-acides ou des peptides, des sels minéraux, des substances apolaires comme des glucides. Il peut aussi s'agir d'un hydrolysat peptidique, total ou partiel, obtenu par action d'un acide fort (HCl, HBr, SO_4H_2) ou d'une base forte ($\text{Ba}(\text{OH})_2$). Le problème consiste à obtenir une solution contenant exclusivement les acides aminés et les peptides. La méthode la plus simple consiste à faire passer la solution sur une colonne de résine à échange de cations fortement acide (Amberlite IR I20) : au cours de cette opération, seuls les cations seront fixés par la résine ; les anions (Cl^- , Br^- , SO_4^-) non retenus, sont éliminés au bas de la colonne. Après lavage soigneux de la colonne, il suffit alors d'éluer sélectivement les acides aminés et les

peptides par un cation dont l'affinité vis-à-vis de la résine sera compris entre celle des acides aminés et peptides et celles des ions minéraux fixés : on emploie en général, une solution d'ammoniaque 2 N qui élue les composés aminés sans éluer les cations minéraux comme Na^+ , K^+ , Ca^{++} . On obtient donc au bas de la colonne, une solution ammoniacale d'acides aminés et de peptides qu'il suffira d'évaporer à sec pour enlever l'ammoniaque.

Cette opération de dessalage d'une solution d'acides aminés ou de peptides est indispensable avant l'étude ultérieure par chromatographie de partage.

2) Application des résines au fractionnement des peptides : Dans ce domaine, deux types généraux de techniques peuvent être utilisés :

- l'analyse par déplacement (PARTRIDGE)
- l'analyse par élution

a) Dans l'analyse par déplacement (PARTRIDGE) (I09), le mélange d'acides aminés est fixé dans une zone restreinte située au sommet de la colonne de résine. La colonne est alors élue par une solution éluante diluée (NH_4OH ou HCl suivant qu'il s'agit d'une résine à échange de cations ou d'anions).

Les divers acides aminés sont ainsi élués par groupes, dans l'ordre de la valeur de leur pK_1 (COOH) (DAVIES) (II0) ou de leur pK_2 (NH_2) (PARTRIDGE et BRIMLEY) (III) : c'est-à-dire que les acides aminés les plus acides sont élués les premiers dans le cas d'une résine à échange de cations ; dans le cas d'une résine à échange d'anions, ils sont, au contraire, élués en fin d'opération.

b) L'analyse par élution : L'analyse par élution, telle qu'elle a été préconisée par MOORE et STEIN (II2), permet une résolution beaucoup plus complète, non seulement des acides aminés, mais aussi des peptides. Dans cette technique, l'élution est réalisée, soit par une solution chlorhydrique de concentration croissante (1,5 N ; 2,5 N ; 4 N ; ... (MOORE et STEIN) (II3)), soit au moyen de tampons,

volatils (HIRS, MOORE et STEIN) (II4), ou non (MOORE et STEIN) (II5) de pH croissants. Dans ce dernier cas, les composés les plus acides sont, en général, élués en premier, puis les composés neutres et enfin les composés basiques. Certains acides aminés et peptides basiques sont, néanmoins, difficilement élués malgré l'augmentation du pH ; aussi est-on amené à augmenter la température de la colonne au fur et à mesure de l'élution.

Dans cette méthode, on peut faire varier les conditions d'utilisation de la résine suivant la complexité et la nature du mélange peptidique à séparer.

La chromatographie des acides aminés et des peptides sera, en général, effectuée sur résine Dowex 50. Le fractionnement et la purification des protéines peuvent être abordés par l'emploi d'une résine à échange de cations faiblement acide comme l'Amberlite IRC 50 (purification de la ribonucléase) (HIRS, MOORE et STEIN) (II6).

Le degré de réticulation a une grande importance : alors que des séparations chromatographiques d'acides aminés sont possibles avec des résines à 8 et 12 p.100 de liaisons croisées, la séparation des peptides n'est guère satisfaisante avec de telles résines ; il est nécessaire d'employer des résines à 4 ou 2 p.100 de liaisons croisées, qui donnent des zones d'élution bien délimitées. On admet que les peptides comprenant 10 à 20 résidus d'acides-amino ne donnent lieu à de bonnes séparations que sur la résine à 2 p.100 de liaisons croisées, alors que les peptides comprenant 5 à 10 résidus peuvent être fractionnés sur une résine à 4 p.100 de liaisons croisées.

β) Techniques secondaires : Ces méthodes secondaires de fractionnement ne permettent la séparation que de catégories bien définies de peptides ou d'acides aminés ; elle fait, en général, appel à des phénomènes d'adsorption (FROMAGEOT et al.) (II7).

Ainsi l'alumine acide retient les acides aminés dicarboxyliques et les peptides acides, en solution aqueuse saturée d'hydrogène sulfuré et neutralisée. L'élu-tion est effectuée par l'acide chlorhydrique 2 N.

De même, le gel de silice retient spécifiquement les bases hexoniques et les peptides basiques en solution neutralisée. L'élu-tion se fait alors par HCl N /10.

Enfin, le charbon activé permet l'adsorption de tous les acides aminés aromati-ques et des peptides contenant ces acides aminés en solution aqueuse saturée d'hy-drogène sulfuré. L'élu-tion est effectuée par de l'eau saturée d'acétate d'éthyle et d'hydrogène sulfuré.

b) Techniques expérimentales appliquées à la polymyxine B

α) Chromatographie sur papier : La séparation des peptides peut se faire par chromatographie unidimensionnelle. Dans ce cas, il suffit de placer sur une ligne de départ un certain nombre de gouttes de la solution à étudier (3 à 4 cm de séparation entre chaque goutte), tandis qu'une goutte nettement isolée à chaque extrémité de la ligne servira de guide après révélation à la ninhydrine pour le découpage des zones sur le reste du chromatogramme. La quantité de chaque peptide à séparer ne doit pas, en général, excéder 50 µg dans chaque goutte appliquée au départ ; une chromatogra- phie préliminaire avec des doses croissantes de la solution à séparer renseigne sur la quantité optimale.

Une seule chromatographie ne suffit pas toujours à séparer parfaitement un mélange complexe de peptides. Il est alors nécessaire de fractionner à nouveau chaque zone récupérée dans un autre solvant chromatographique.

On peut aussi effectuer une chromatographie bidimensionnelle. Dans ce cas, on réalise, parallèlement, plusieurs chromatogrammes bidimensionnels ; après séchage, l'un d'entr'eux est révélé à la ninhydrine et sert de guide ; les autres sont exami- nés en lumière de WOOD après un séjour de 20 minutes à l'étuve à 100°C.

Quel que soit le chromatogramme, les taches, après localisation, sont découpées et éluées par lavage à l'eau. On peut découper les fragments de papier en petits morceaux et récupérer les peptides par extraction à l'eau et centrifugations successives. Mais il est préférable d'utiliser les dispositifs simples d'éluition décrits par CONSDEN (II8) (suction du papier mouillé au moyen d'un tube capillaire) ou DENT (II9) (lavage chromatographique). Nous employons un dispositif dérivé de la technique de DENT (DUMAZIERT et coll.) (I20).

Le papier de chromatographie pour la séparation des peptides est le Whatman n° I. Les solvants sont, en général, les mêmes que pour la séparation des aminoacides, c'est-à-dire le butanol/acide acétique ou le phénol aqueux (3 p.100 d'ammoniac + HCN). On peut aussi avoir recours au système butanol/pyridine/acide acétique/eau (30 : 6 : 20 : 24) (LI et coll.) (I2I).

β) Electrophorèse sur papier : Les séparations électrophorétiques de peptides sont effectuées dans un appareil à évaporation contrôlée (MACHEBOEUF et coll.) (I22) qui permet d'obtenir des taches peptidiques bien délimitées. Nous utilisons du papier Arches 304 (28 x 40 cm) et un système-tampon pyridine/acide acétique/eau (30 : 100 : 4870) de pH 3,9 (GRASSMANN et coll.) (I23) ; ce système-tampon a l'avantage d'être volatil et ainsi de permettre d'appliquer cette technique à la séparation des peptides.

Après avoir humecté la feuille de papier au moyen du tampon et avoir laissé le papier et le liquide s'équilibrer, on dépose le mélange peptidique à séparer sur une ligne de départ située du côté anodique. Une différence de potentiel de 130 volts (20 mA) est alors appliquée pendant 9 heures. La feuille de papier est ensuite séchée et une bande longitudinale est découpée, qui servira de guide, après révélation pour la récupération des différentes zones.

On peut associer l'électrophorèse et la chromatographie de manière à réaliser un fractionnement bidimensionnel : l'électrophorèse est effectuée dans la 1ère

dimension et une chromatographie dans le système butanol/acide acétique/ou butanol/pyridine/acide acétique dans la 2ème dimension ; le papier est du Schleicher et Schüll n° 2040 a (60 x 60 cm).

γ) Chromatographie sur résine à échange de cations : Nous ne décrivons dans ce chapitre que les modalités d'application aux peptides de la méthode de MOORE et STEIN (124). Elles ne peuvent donner une solution générale à tous les problèmes de séparation des mélanges peptidiques et nous avons été amené à modifier certains points en fonction du substrat étudié.

1- Préparation de la Résine : La résine Dowex 50 x 4 (4 p.100 de liaisons croisées), obtenue par tamisage entre les tamis français 200 et 270, est préparée suivant la technique de HIRS, MOORE et STEIN (125). 100 g de la résine sont ajoutés lentement, en agitant vigoureusement, à 300 ml de NaOH 2 N. Quand la température du mélange cesse d'augmenter, on porte au bain-marie à 60-70°C pendant 5 heures, en agitant. Après refroidissement et sédimentation de la résine, le liquide surnageant est décanté et la résine est alors lavée deux fois par décantation avec 400 ml d'eau distillée.

La résine est à nouveau traitée par 300 ml de NaOH 2 N pendant une nuit, puis lavée 10 fois par décantation avec des portions de 300 ml d'eau distillée. On transvase la résine dans un entonnoir de Büchner et on la lave à l'eau distillée jusqu'à neutralité du filtrat. La résine est alors traitée sur le filtre par 100 ml de HCl 4 N, ajoutés lentement et passant lentement à travers la résine, puis par 800 ml de HCl 2 N. Un lavage avec plusieurs litres d'eau distillée, est enfin nécessaire pour obtenir un filtrat neutre.

2- Préparation de la colonne : La résine est alors suspendue dans 250 ml de NH_4OH 4 M, en agitant jusqu'à ce que la température cesse d'augmenter. Après refroidissement, la résine est remise sur le filtre et lavée avec 300 ml d'eau distillée. Dans le temps suivant, la résine est tamponnée à pH convenable au moyen du

premier tampon utilisé dans la chromatographie ultérieure. Nous avons utilisé du tampon formiate d'ammonium $M/20$ de pH 2,45 (tampon A du tableau VIII).

Environ 200 ml de ce tampon sont filtrés lentement à travers le gâteau de résine : celle-ci est transvasée et mise en suspension dans 150 ml du même tampon et le mélange est agité doucement par intermittence, pendant 2 heures, de façon à éliminer les bulles d'air. La suspension est finalement versée dans un tube de verre de 150 cm de long et de 0,9 cm de diamètre intérieur. L'extrémité inférieure effilée est garnie d'un disque de plexiglas perforé, surmonté d'un disque de toile de verre. Le remplissage de la colonne est effectué selon la technique de MOORE et STEIN (126), de façon à obtenir une colonne parfaitement homogène : la suspension de résine est séparée en cinq fractions de volume approximativement égal ; chaque fraction est alors versée avec précaution le long de la paroi intérieure du tube : on accélère légèrement la sédimentation de la résine en exerçant à l'extrémité inférieure de la colonne une dépression de l'ordre de 10 à 15 cm de mercure. Les fractions sont successivement ajoutées quand la surface liquide n'est plus qu'à 3 ou 4 cm de la résine et ceci jusqu'à ce que la hauteur totale de la résine atteigne 110 cm.

A la partie supérieure de la colonne, on installe un dispositif d'alimentation en liquide d'élution schématisé sur la Fig. 16, qui permet, par le mélange successif des tampons, d'obtenir un gradient de pH croissant (Fig. 16).

La hauteur du flacon II est réglée pour obtenir au bas de la colonne un écoulement de 1 ml en 7 minutes environ. L'extrémité de la colonne est adaptée au vase récepteur d'un collecteur de fractions (mesure à volume constant). Des fractions de 8 millilitres sont ainsi recueillies.

3 - Fractionnement de l'hydrolysât partiel de polyryxine : L'hydrolysât partiel de polyryxine (6 jours à 37°C dans HCl 11,2 N) dissous dans 0,5 ml du tampon A, est versé en haut de la colonne et imprègne immédiatement la résine. On rince la partie libre du tube par 0,5 ml de tampon A et on remplit complètement avec ce même

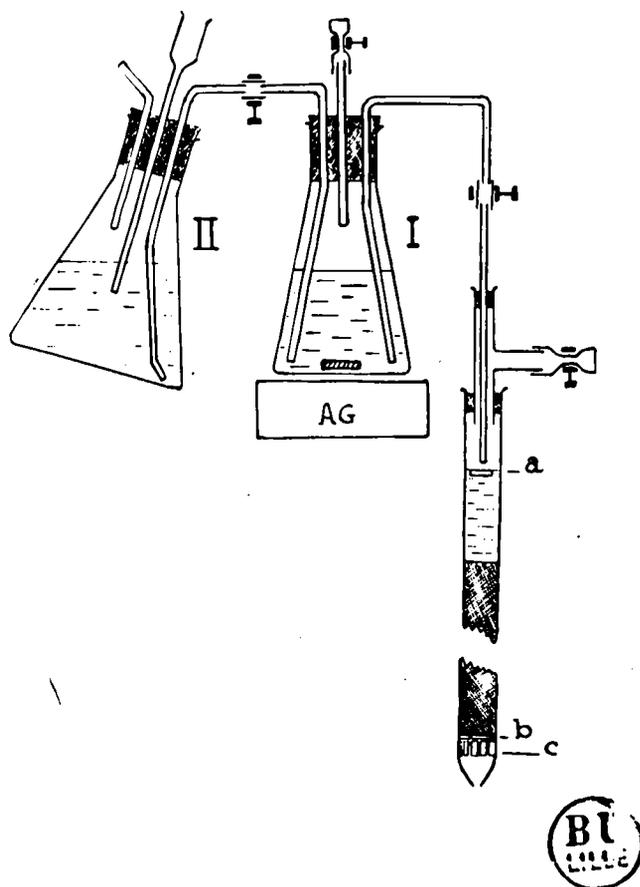


Figure I6

Schéma de montage de la colonne de Dowex 50 avec élution à pH croissant

AG = agitateur magnétique

a = Disque de polyéthylène

b = Disque de toile de verre

c = Disque de plexiglas perforé

tampon. Le flacon I est rempli de 200 ml de tampon A et le flacon II de 400 ml de tampon B. Après la mise en route de l'agitateur magnétique (A de la figure), l'élution est commencée et des fractions de 8 ml sont recueillies dans les tubes du collecteur.

Les changements de tampon indiqués sur le Tableau VIII et la Fig. 17 ont été établis en fonction d'une expérience préliminaire effectuée sur la même résine et avec un hydrolysate identique, ce qui permet de se rendre compte de l'allure de la courbe d'élution. On peut ainsi, lors de l'expérience définitive, soit rectifier l'élution des zones particulièrement chargées en peptides en diminuant la variation du pH par l'emploi d'un plus grand volume de tampon, soit réduire le volume du tampon utilisé pour augmenter la variation du pH dans les zones où ne se trouvent pas de peptides.

Lorsque la solution du flacon II est épuisée, on la remplace par la quantité de tampon suivant, indiquée dans le Tableau VIII.

Le contenu de chaque tube du collecteur est versé dans un verre de montre numéroté et évaporé à sec à l'air libre. Les verres de montre sont ensuite déposés dans un récipient en cuivre à double paroi, permettant une circulation d'eau à 30/40°C et muni d'un ajutage latéral relié, par l'intermédiaire d'un piège refroidi, à une pompe à vide à palettes de grand débit. Le récipient est hermétiquement fermé à l'aide d'un joint de caoutchouc, par une plaque épaisse de plexiglas. Dans ces conditions, la sublimation des formiate et acétate d'ammonium des tampons est facilement réalisée en quelques heures. Le résidu de chaque verre de montre est repris dans 0,4 ml d'eau distillée : 10 microlitres de la solution obtenue sont très uniformément déposés sous forme d'une traînée de 10/12 mm de longueur sur une feuille de papier Arches 304. Après séchage, les empreintes sont révélées à l'aide d'une solution acétonique de ninhydrine à 0,2 p.100, à 100°C, pendant 15 minutes. L'intensité de chaque tache est estimée à l'aide d'un photodensitomètre équipé d'un filtre

TABLEAU VIII

Composition des solutions tampons
établie d'après les données de THOMPSON (I27)

| Tampons | A | B | C | D | E | E | G |
|----------------------------------|--------------|------|------|------|------|-----|------|
| HCOOH 2 M | 450 | 200 | 138 | 92 | | | |
| CH ₃ COOH 2 M | | | | 73,3 | 220 | 300 | 250 |
| NH ₄ OH M | 50 | 200 | 200 | 200 | 200 | 400 | 400 |
| Alcool benzylique (*) | 15 | | | | | | |
| Thymol (**) | 0,5 g | | | | | | |
| H ₂ O | q.s.p. 1.000 | | | | | | |
| pH obtenu | 2,45 | 3,68 | 4,10 | 4,36 | 4,60 | 5 | 5,41 |
| Quantité utilisée pour l'élution | | 400 | 960 | 600 | 400 | 400 | 800 |

(*) L'alcool benzylique facilite, dans une certaine mesure, l'élution des composés aromatiques.

(**) Le thymol est utilisé, ici, comme agent antiseptique : l'élution se prolonge, en effet, pendant plusieurs semaines. Le thymol est dissous au préalable dans l'alcool benzylique.

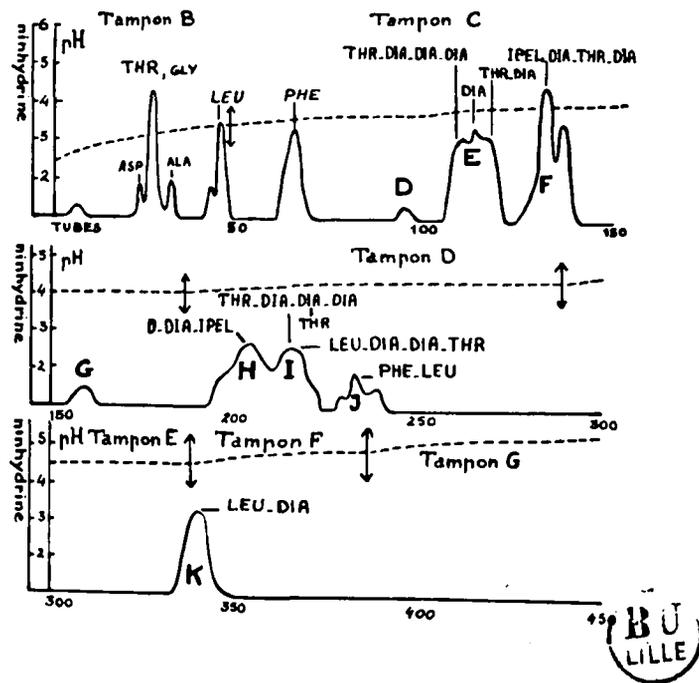


Figure 17

Courbe d'élution d'un hydrolysate partiel de polymyxine B sur Dowex 50 x 4.

La courbe en trait plein est construite à partir des intensités photométriques de la réaction à la ninhydrine d'une partie aliquote de chaque tube de l'éluat. La structure des principaux peptides de l'éluat a été indiquée au niveau des sommets correspondants de la courbe d'élution (E, F, H, I, J, K).

Abréviations : voir Fig. 6. IPEL = Acide (+)6-méthyl-octanoïque. Il s'agit d'un acide isopélargonique. Par souci de simplification, nous avons adopté comme HAUSMANN cette abréviation IPEL, qui n'est pas conforme à la nomenclature internationale.

La présence en faible quantité d'acide aspartique (ASP), de glycofolle (GLY) et d'alanine (ALA) s'explique par l'hydrolyse d'oligopeptides qui sont des impuretés de la préparation de polymyxine utilisée.

La courbe en trait discontinu indique la variation de pH observée au cours de l'élution. Les flèches verticales, qui coupent cette courbe, figurent les changements de tampon (B, C, D, E, F, G) effectués au cours de l'opération.

à 530 m μ . Il est possible, de cette façon, de construire tube par tube, la courbe d'élution représentée sur la Fig. 17.

Les tubes correspondant à une même fraction, sont rassemblés et les différentes fractions obtenues sont soumises à des critères de pureté en électrophorèse sur papier à pH 3,9 ou en chromatographie sur papier, dans les systèmes classiques : butanol/ acide acétique ou phénol en atmosphère ammoniacale. Les fractions hétérogènes peuvent être elles-mêmes fractionnées par ces deux types de techniques.

§) Chromatographie sur charbon : La polymyxine B contenant un seul résidu de phénylalanine, se prête heureusement à un fractionnement de base sur charbon.

Cette technique de fractionnement permet de séparer du mélange peptidique tous les peptides contenant de la phénylalanine. Le mode opératoire est celui de FROLIAGEOT et coll. (128).

Une suspension de 5 g de charbon Activit XL 50 dans 40 ml d'acide acétique à 20 p.100 est versée dans un filtre en verre fritté de porosité G₃ ; après aspiration de l'acide acétique, le charbon est lavé par 150 ml d'eau bouillante. Transvasé dans un vase cylindrique, le charbon est ensuite agité pendant 10 minutes avec 100 ml d'une solution aqueuse d'éphédrine-base à 0,02 p.100 ; cette suspension est alors versée dans un tube de verre de 50 cm de longueur et 8 mm de diamètre intérieur. Après écoulement de la solution d'éphédrine, la colonne de charbon est lavée par 150 ml d'eau saturée d'hydrogène sulfuré, puis par 350 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 5 p.100 saturée d'hydrogène sulfuré. L'écoulement des liquides est facilité par l'application au sommet de la colonne d'une pression de 20 à 30 cm de mercure.

L'hydrolysât partiel de polymyxine, dissous dans quelques millilitres d'acide acétique à 5 p.100 saturé d'hydrogène sulfuré, est déposé au sommet de la colonne ; la colonne est ensuite lavée, avec 500 ml d'acide acétique à 5 p.100, saturé d'hydrogène sulfuré. La phénylalanine et les divers peptides à phénylalanine

restent adsorbés sur le charbon : leur élution est assurée par passage d'un litre environ d'eau distillée saturée d'acétate d'éthyle et d'hydrogène sulfuré. Après concentration, l'éluat est étudié par électrochromatographie (Fig. 18).

3 - ETUDE DES PEPTIDES

L'étude des peptides isolés lors du fractionnement d'un hydrolysât partiel comprend les mêmes stades que celle du polypeptide initial. Elle est cependant facilitée par leur plus grande simplicité.

Les peptides les plus complexes sont à nouveau soumis à une hydrolyse partielle, suivie d'un fractionnement.

Les peptides simples (2 à 5 résidus d'acides aminés) sont étudiés seulement du point de vue de leur composition et de leurs acides aminés terminaux.

a - Contrôles de pureté

Le premier problème qui se pose est celui de l'homogénéité des fractions peptidiques isolées. Pour ce contrôle, on utilise les critères de pureté suivants : électrophorèse sur papier, chromatographie sur papier à l'aide de différents solvants; la détermination des extrémités N-terminales par la méthode de SANGER peut aussi fournir des renseignements à cet égard : la présence de plusieurs acides aminés N-terminaux est presque toujours la preuve de l'hétérogénéité du matériel employé.

Il faut signaler que le papier à chromatographie contient de faibles quantités d'acides aminés et de peptides (glycocolle et acide glutamique) : ces substances sont concentrées au fur et à mesure des récupérations et peuvent interférer avec les peptides séparés par le fractionnement, surtout si celui-ci est effectué sur de faibles quantités du mélange. Il est alors souvent utile de laver préalablement le papier à l'eau distillée, ou mieux, selon la technique de HANES et ISHERWOOD (129) où le papier est lavé successivement avec : CO_3Na_2 N, eau distillée, CH_3COOH 2N, eau distillée, acétate de calcium 1 p.100, eau et éthanol aqueux à 50 p.100.

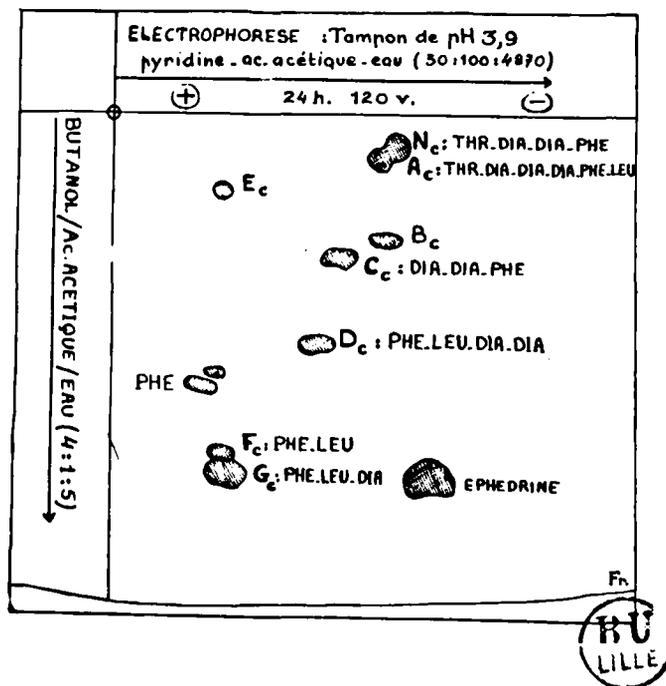


Figure 18

Représentation schématique d'un électrochromatogramme de peptides à phénylalanine d'un hydrolysât partiel de polymyxine B

Fr = front du solvant butanol/acide acétique

L'éphédrine provient du pré-traitement du charbon activé (Voir le texte).

b - Principe des méthodes d'étude des petits peptides

Les contrôles de pureté ayant été effectués, le peptide pur est soumis à une hydrolyse totale et l'hydrolysats obtenu est étudié par chromatographie bidimensionnelle sur papier et dosage des acides aminés suivant les modalités que nous avons décrites.

L'étude des acides aminés terminaux des peptides peut s'effectuer par des méthodes identiques à celles des polypeptides et des protéines.

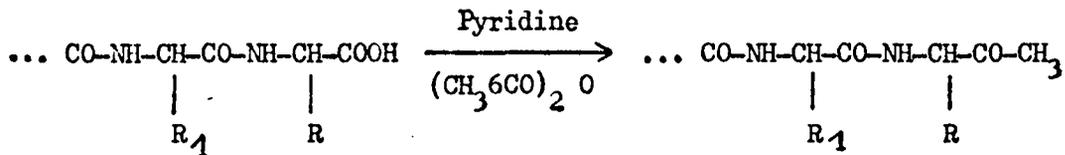
Les méthodes les plus employées sont la méthode aux DNP-amino-acides de SANGER (130) et la méthode à la carboxypeptidase (FRAENKEL-CONRAT) (131). A ces méthodes, nous pouvons ajouter deux méthodes simples, applicables exclusivement aux petits peptides : la méthode de CONSDEN et al. (132) par désamination, et celle de TURNER (133).

1 - Méthode de désamination : Les groupements aminés des peptides sont désaminés chimiquement par les vapeurs nitreuses : aux fonctions aminées sont donc substituées des fonctions alcooliques secondaires. Après hydrolyse du peptide, on ne peut plus identifier après chromatographie par révélation à la ninhydrine que les acides aminés en position non N-terminale.

L'application de cette technique aux peptides contenant des acides aminés basiques, comme la lysine, l'ornithine ou l'acide α, γ -diaminobutyrique, est délicate, car les fonctions ω NH_2 de ces acides sont, elles aussi, susceptibles de désamination ; CONSDEN et al. cependant, par l'emploi de conditions extrêmement douces, ont pu éviter cette désamination en ω des peptides formés par hydrolyse partielle de la gramicidine S (134).

Enfin, signalons que le noyau phénolique de la tyrosine est susceptible d'être nitré au cours de la réaction, ce qui entraîne une identification plus délicate de cet amino-acide.

2 - Méthode de TURNER : Cette méthode est applicable à l'étude de l'extrémité C-terminale des petits peptides : par chauffage des peptides en présence d'anhydride acétique et de pyridine, les groupements carboxyliques sont transformés en groupements méthylcétone, selon la réaction de DAKIN (135).



Après hydrolyse, on pourra identifier tous les acides aminés en position non C-terminale. L'acide aminé C-terminal transformé en aminocétone pourra, dans certains cas, être identifié par chromatographie sur papier.

c - Techniques expérimentales utilisées

α) Méthode des DNP-amino-acides de SANGER : La technique des DNP-amino-acides a été étudiée à propos des extrémités N-terminales des peptides. L'application de cette méthode aux petits peptides est cependant un peu spéciale ; c'est pourquoi nous exposerons en détail, certains points particuliers.

1) La dinitrophénylation : La dinitrophénylation est effectuée à une température de 40°C sous agitation, en maintenant le pH à 9, par addition de NaOH \underline{N} /10. La dinitrophénylation, dans ces conditions, est complète en 1 h.30 et ne donne lieu à la formation que de très petites quantités de dinitrophénol. A la fin de la réaction, l'excès de DNFB est enlevé par extractions répétées à l'éther.

Le DNP-peptide est extrait de la solution aqueuse, après acidification, à l'aide de solvants organiques comme l'éther, l'acétate d'éthyle ou le butanol. Le choix de ces solvants est empirique et dépend beaucoup de la taille du peptide dinitrophénylé : alors que les DNP-dipeptides sont, en général, extractibles à l'éther, les DNP-tripeptides seront extraits à l'acétate d'éthyle. On effectuera donc l'extraction par l'emploi successif de ces solvants.

2) L'hydrolyse du DNP-peptide et l'identification des DNP-amino-acides éthéro-solubles se feront suivant les modalités décrites plus haut.

β) Méthode à la carboxypeptidase : Cet enzyme libère l'acide aminé C-terminal des peptides (*). L'enzyme continue son action sur le reste de la chaîne peptidique, en détachant le nouvel acide aminé terminal ; il est donc nécessaire d'établir une cinétique enzymatique dans les conditions suivantes :

Le peptide est mis en solution aqueuse amenée à pH 7,5 par addition de sesqui-carbonate d'ammonium. A cette solution, on ajoute une suspension de carboxypeptidase (correspondant à environ 1/20 mg) et on porte à l'étuve à 37°C. Des prélèvements sont effectués après 30 minutes, 1 heure, 1 h.30.

L'enzyme est inactivé par ébullition et les sels minéraux enlevés par passage sur une petite colonne d'Amberlite IR 120, suivi d'une élution à l'ammoniaque 2 N. L'éluat est alors étudié par chromatographie sur papier.

γ) Méthode de TURNER : Le peptide est dissous ou mis en suspension dans de l'anhydride acétique (0,75 ml) en présence de pyridine (0,50 ml). Le mélange est chauffé en tube scellé pendant 3 heures, à 150°C. Le produit de la réaction est transvasé dans un verre de montre et évaporé à sec au bain-marie. L'élimination complète des solvants s'effectue par dissolution dans l'eau et évaporations répétées au bain-marie. Enfin, le peptide traité est hydrolysé par HCl 5,6 N dans les conditions habituelles et les acides aminés résiduels sont identifiés par chromatographie sur papier.

d - Résultats fournis par l'étude de la polymyxine B

α) Hydrolyse partielle de la DNP-polymyxine B : Nous avons soumis la DNP-polymyxine à une hydrolyse à 100°C.

(*) La carboxypeptidase cristallisée n'agit pas sur les dipeptides. Toutefois, nous avons pu observer qu'elle hydrolysait des dipeptides de synthèse comme glycyl-tyrosine et glycyl-tryptophane (BISERTE et D.AUTREVAUX) (136).

L'hydrolyse est effectuée sur 300 mg de DNP-polymyxine B, au moyen d'un mélange à parties égales d'acide formique et d'HCl 5,6 N (30 ml) pendant 1 h.30, à l'ébullition, sous réfrigérant à reflux. Le rôle de l'acide formique est de faciliter la dissolution de la DNP-polymyxine dans le mélange hydrolysant. L'hydrolysate obtenu est alors évaporé à sec, sous pression réduite.

Cet hydrolysate ne contenant aucune fraction éthérosoluble, est fractionné par passage sur une colonne de talc-Kieselguhr, de façon à séparer dans l'effluent, les amino-acides et peptides non dinitrophénylés et dans l'éluat, les DNP-amino-acides et DNP-peptides hydrosolubles (SANGER) (137).

La colonne est préparée par mélange de 8 g de Kieselguhr (Hyflo-Supercel) et 20 g de talc. Le mélange est, au préalable, soigneusement lavé par décantations successives à l'eau, à l'éthanol et à l'HCl N. La suspension de la poudre obtenue dans de l'HCl N est alors versée sur la colonne ; le tassement est obtenu par simple sédimentation de la poudre.

L'hydrolysate est dissous dans 5 ml d'HCl N et versé au sommet de la colonne.

La colonne est alors lavée au moyen de 250 ml d'acide chlorhydrique N. Dans ces conditions, tous les acides aminés et peptides dinitrophénylés restent adsorbés sur la colonne, alors que l'on retrouve dans l'effluent tous les acides aminés et peptides non dinitrophénylés.

L'éluat des composés dinitrophénylés est assurée par de l'alcool chlorhydrique : alcool/HCl N (4 : 1). Cette éluat donne lieu à la formation de deux bandes colorées E_1 et E_2 , dont l'une (E_1) assez rapide, semble correspondre à des composés de poids moléculaire relativement faible.

L'étude de l'effluent par électrophorèse à pH 3,9, montre la présence de deux zones : une zone neutre et une zone basique. Après récupération, chacune de ces zones est à nouveau soumise à une chromatographie bidimensionnelle dans le butanol acétique et le phénol-ammoniaque.

La zone neutre apparaît composée de thréonine, de phénylalanine et de leucine libres. On observe de plus, une tache anormale ne correspondant pas à un acide aminé. La récupération et l'hydrolyse totale nous ont révélé que cette tache correspondait à un peptide comprenant, en proportions sensiblement équimoléculaires, la thréonine et l'acide α, γ -diaminobutyrique.

La zone basique ne révèle la présence que du seul acide α, γ -diaminobutyrique. Cet amino-acide n'étant pas désaminé par la D-acidaminodéshydrogénase du rein de Mouton, est donc sous la forme L, naturelle.

L'élution de la colonne de talc-Kieselguhr donne lieu à la formation de deux zones colorées, qui ont été recueillies séparément ; seule, la zone E_1 , la plus rapide, s'est prêtée à un fractionnement simple : par électrophorèse sur papier, on distingue deux composés E_{11} et E_{12} .

Le composé E_{11} est homogène en chromatographie sur papier, dans le système butanol/acide acétique, et il a été identifié à l'acide γ -DNP-diamino-butyrique.

Le composé E_{12} , purifié par chromatographie séparative dans le butanol acétique et hydrolysé, comporte un enchaînement (Dia, γ -DNP-Dia).

Des résultats fragmentaires de cette expérience, nous pouvons retenir les conclusions suivantes :

- 1 - L'un des acides L- α, γ -diaminobutyrique de la Polymyxine B n'est pas dinitrophenylable, ce qui confirme donc les résultats obtenus par hydrolyse totale de la DNP-polymyxine.
- 2 - Cet acide L- α, γ -diaminobutyrique, non substituable par le DNFB, se trouve dans la polymyxine B, situé entre un résidu thréonine et un autre résidu diaminobutyrique. Le faible rendement des peptides obtenus par ce type d'hydrolyse à 100°C, ne nous a malheureusement pas permis de définir l'enchaînement exact.

β) Chromatographie sur Dowex 50 : Les différentes fractions obtenues par chromatographie sur Dowex 50 se sont, pour la plupart, révélées hétérogènes. Il a donc été nécessaire de parfaire ce fractionnement de base, en effectuant la séparation des peptides constituant chaque fraction, soit par électrophorèse séparative à pH 3,9, soit par chromatographie sur papier.

Les faibles quantités isolées de chaque peptide ne nous ont pas toujours permis de faire toutes les déterminations de structure, en particulier, l'étude simultanée des deux extrémités N et C-terminales du peptide.

Les principaux résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau IX.

La structure de certains des peptides rassemblés dans ce tableau demande quelques commentaires.

1) Peptide H₁ :

Le peptide H₁ se comporte en électrophorèse, sur papier à pH 3,9, comme un acide aminé neutre. Après hydrolyse totale, un seul composé "ninhydrine positive" peut être décelé : l'acide α,γ-diaminobutyrique. Après dinitrophénylation du peptide et hydrolyse totale, un seul dérivé dinitrophénylé hydrosoluble peut être identifié ; par chromatographie bidimensionnelle, sur papier (butanol/acide acétique et phénol), il se comporte comme l'acide γ-DNP-diamino-butyrique trouvé dans les hydrolysats totaux de la DNP-Polymyxine B (*).

Le peptide H₁ est rapidement hydrolysable à 100°C. Par chauffage à reflux dans HCl 5,6 N, on obtient la cinétique d'hydrolyse de la Fig. 19 (électrophorèse à pH 3,9).

L'extraction à l'éther de l'hydrolysat ainsi obtenu, permet d'isoler un acide gras, qui peut être facilement repéré en chromatographie ascendante, dans une solution aqueuse à 66 p.100 d'acide acétique. La révélation s'effectue par formation

(*) On peut séparer l'acide α-DNP-diaminobutyrique de l'acide γ-DNP-diaminobutyrique par électrophorèse dans un tampon borate de Na - acide borique 0,2 M de pH 9,1. L'électrophorèse est effectuée avec immersion de la bande papier sous toluène, pour supprimer toute évaporation et sous une différence de potentiel de 240volts pendant 4 heures.

TABLEAU IX

Composition et structure des fractions isolées par chromatographie sur Dowex 50

| Fractions Dowex 50 | Fractionnement secondaire. | Peptides | Purification | Composition | α NH ₂ | Séquence |
|--------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| A | | | | Thr | | Thréonine |
| B | | | | Leu | | Leucine |
| C | | | | Phe | | Phénylalanine |
| D | | | CCP But. | Cpl. | | Impureté peptidique |
| E | E 3,9 | E ₁ E (B) | CCP Phénol R _f 0,73 | Thr 1 Dia 3 | DNP-Thr | Thr - Dia - Dia - Dia |
| | | E ₂ E (B) | CCP Phénol R _f 0,63 | Dia | | Acide α,γ -diamino-butérique |
| | | E ₃ E (N) | CCP Phénol R _f 0,67 | Thr 1 Dia 1 | | (Thr, Dia) |
| | | E ₄ E (B) | CCP Phénol R _f 0,69 | Cpl. | | Impureté |
| | | E ₅ | CCP Phénol | β -ala | | Impureté |
| F | | F ₁ E (N) | CCP But. Benz. | Thr 1 Dia 2 Ipel | | |
| | | F ₂ E (A) | | Glut Gly | | Impureté |
| G | | | CCP But. R _f 0,70 | Cpl. | | Impureté |
| H | E 3,9 | H ₁ E (N) | CCP But. R _f 0,70 | Dia | (γ -DNP) Dia | Ipel-Dia |
| | | I ₁ E (B) | CCP Phénol R _f 0,70 | Thr 1 Dia 2 | | (Thr, Dia, Dia) |
| I | E 3,9 | I ₂ E (N) | CCP Phénol R _f 0,72 | Thr 1 Leu 1 Dia 2 | | (Leu, Dia, Dia) Thr (*) |
| | | I ₃ E (B) | CCP Phénol R _f 0,70 | Dia | | (Dia) ⁿ |
| | | I ₄ E (B) | CCP Phénol R _f 0,77 | Cpl. | | Impureté |
| | | I ₅ E (β -Ala) | CCP Phénol R _f 0,82 | Thr 2 Dia 3 | DNP-Thr | Thr Thr > (Dia, Dia, Dia) |
| J | E 3,9 | J ₁ E (N) | CCP But. Benz. | Phe 1 Leu 1 | DNP-Phe | Phe-Leu |
| | | J ₂ E (B) | | Phe Leu Dia Thr | | |
| K | | K ₁ E (B) | CCP But. Pyr. | Leu 1 Dia 1 | | (Leu, Dia) |

Abréviations utilisées :

Pour les acides aminés, voir légende de la Fig. 5.

 γ -DNP-DIA = Acide γ -DNP-diaminobutyrique

E 3,9 = électrophorèse sur papier à pH 3,9

(B) = comportement analogue aux acides aminés basiques

(N) = comportement analogue aux acides aminés neutres

(β -Ala) = comportement analogue à la β -alanine

(A) = comportement analogue à l'acide aspartique

CCP = chromatographie de partage sur papier, soit dans le phénol (CCP phénol) soit dans le mélange n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) (CCP but.), soit dans le mélange n-butanol/pyridine/acide acétique/eau (30:6:30:24) (CCP But. Pyr.), soit dans le mélange n-butanol/alcool benzylique/eau (1:1:1) (CCP But. Benz.).

Cpl. = fraction complexe correspondant à une impureté peptidique.

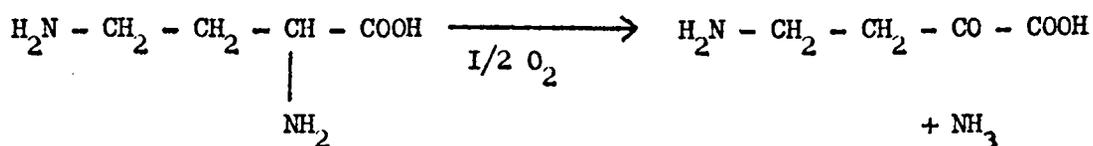
(*) L'extrémité C-terminale du peptide I₂ a été déterminée par les méthodes de TURNER et à la carboxypeptidase.

de ferro-cyanure cuivrique (KAUFMANN et NITSCH) (138) : immersion des bandes dans une solution d'acétate de cuivre (10 ml de solution saturée d'acétate de cuivre dans 240 ml d'eau distillée). Après lavage soigneux à l'eau courante, pendant 15 minutes, les savons de cuivre formés au niveau des taches d'acide gras sont mis en évidence par une solution de ferrocyanure de potassium (50 ml d'une solution à 7,7 g p.100 dans 250 ml d'eau distillée). Les taches apparaissent en pourpre sur fond vert pâle. On peut déceler, par cette méthode, 0,1 mg d'acide gras.

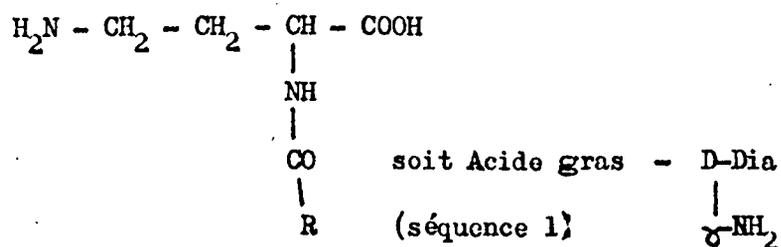
L'acide α, γ -diaminobutyrique du composé H_1 appartient à la série D. L'hydrolysate est incubé à 37°C en présence d'oxygène, pendant 3 heures, avec une solution de D-acidaminodeshydrogénase purifiée de rein de Mouton. Après un chauffage de 10 minutes au bain-marie bouillant, le filtrat obtenu est concentré et étudié en électrophorèse sur papier, à pH 3,9. Après incubation, l'acide α, γ -diaminobutyrique a totalement disparu, tandis qu'un nouveau constituant "ninhydrine positive" apparaît, moins basique que l'acide diaminé (Fig. 20).

Ce composé, récupéré à partir de plusieurs électrophorèses séparatives sur papier, donne une 2,4-dinitrophénylhydrazone qui se place en électrophorèse à pH 8,9 entre celle de l'acide pyruvique et la dinitrophénylhydrazine.

Au cours de la désamination de l'acide α, γ -diaminobutyrique, il se forme donc de l'acide α -céto- γ -aminobutyrique, selon la réaction :



A la suite de ces différentes expérimentations, nous pouvons assigner au composé H_1 la structure suivante :



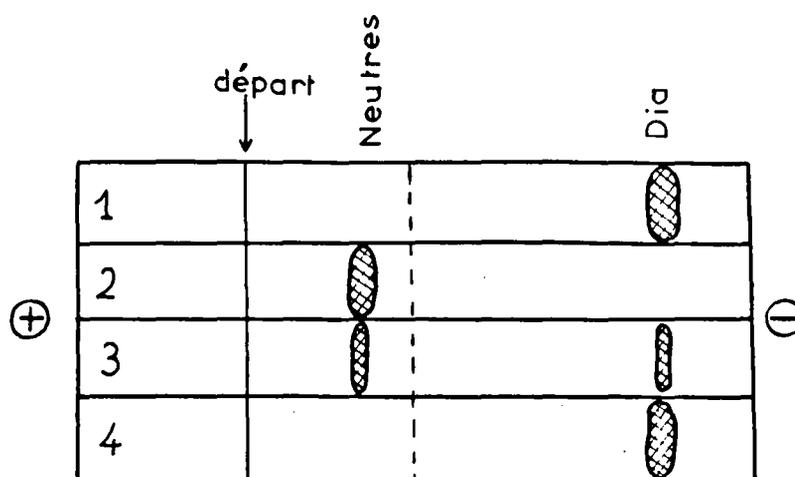


Figure I9

Etude de l'hydrolyse du composé H_1 par l'acide chlorhydrique 5,6 N
à l'ébullition

Schéma d'électrophorèse à pH 3,9 des produits d'hydrolyse (130 volts,
20 mA, 9 heures)

- 1 - Témoin d'acide α, γ -dianinobutyrique
- 2 - Témoin du composé H_1 avant hydrolyse
- 3 - Composé H_1 après 30 minutes d'hydrolyse
- 4 - Composé H_1 après 1 heure d'hydrolyse

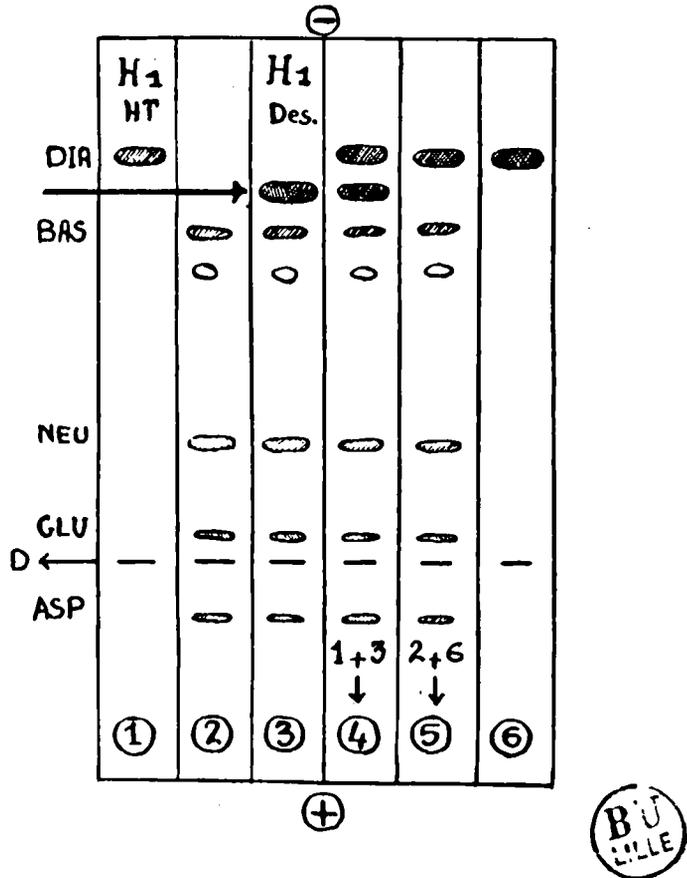


Figure 20

Etude des produits de désamination de l'acide α, γ -diaminobutyrique du composé H_1

Schéma d'électrophorèse à pH 3,9 (130 volts, 20 mA, 9 heures)

Abréviations

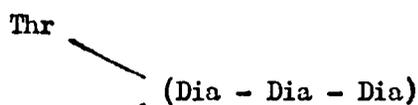
ASP = acide aspartique
 GLU = acide glutamique
 BAS = acides dianinés
 H_1 HT = composé H_1 hydrolysé
 H_1 Des = hydrolysat de H_1 désaminé
 D = ligne de départ de l'électrophorèse
 NEU = acides aminés neutres
 DIA = acide α, γ -diaminobutyrique

- 1 - Hydrolysat total du composé H_1 : présence exclusive d'acide α, γ -diaminobutyrique
- 2 - Témoin de D-acidaminodéshydrogénase. La préparation contient une petite quantité d'acides aminés libres.
- 3 - Filtrat obtenu après désamination de l'acide α, γ -diaminobutyrique du composé H_1 . L'acide α, γ -diaminobutyrique a totalement disparu. Le produit de désamination (acide α -ceto- γ -aminobutyrique) donne une coloration avec la ninhydrine. Sur la figure, sa position est précisée par la flèche.
- 4 - Mélange de 1 + 3
- 5 - Mélange de 2 + 6
- 6 - Témoin d'acide α, γ -diaminobutyrique de synthèse.

Or, l'acide α, γ -diaminobutyrique non dinitrophénylable dans la polymyxine B se trouve sous la forme L : l'hypothèse suivant laquelle cet acide L-diamino-butyrique supporterait l'acide gras, se trouve, de ce fait, infirmée. Il faut donc admettre que la fonction $\gamma\text{-NH}_2$ de cet acide L- α, γ -diaminobutyrique est le point de départ d'une chaîne peptidique greffée à ce niveau sur la partie cyclopeptidique de la molécule, l'extrémité N-terminale de cette ramification étant masquée par l'acide gras.

2) Peptide I₅ :

Le peptide I₅ est constitué de 2 molécules de thréonine et 3 molécules d'acide α, γ -diaminobutyrique. L'hydrolyse totale du dérivé dinitrophénylé montre la présence dans l'extrait étheré de DNP-thréonine et de 2,4-dinitraniline (*). La phase aqueuse résiduelle est constituée d'acide γ -DNP-diaminobutyrique et d'acide α, γ -diaminobutyrique libre et ne contient pas de thréonine libre. On peut donc considérer que les 2 résidus de thréonine sont en position N-terminale dans le peptide I₅ ; cette hypothèse est confirmée par la présence d'un résidu diaminobutyrique non dinitrophénylable : la séquence de ce peptide peut donc s'écrire :



(séquence 2)

De l'étude des autres peptides isolés par ce type de fractionnement, nous pouvons déduire notamment les séquences suivantes :

| | |
|----------------|---------------------|
| J ₁ | Phe-Leu |
| K ₁ | (Leu, Dia) |
| I ₂ | (Leu, Dia, Dia) Thr |

Phe-Leu-Dia-Dia-Thr

(séquence 3)

(*) La dinitraniline présente dans la phase étherée, provient de l'hydrolyse de la DNP-thréonine, particulièrement fragile à l'hydrolyse acide.

8) Fractionnement sur charbon : Les résultats fournis par l'étude des peptides isolés par chromatographie sur Dowex 50 ne fournissent que des renseignements partiels sur la structure des peptides à phénylalanine. Au cours de ce fractionnement, nous n'avons pu, en effet, isoler que deux composés à phénylalanine : la phénylalanine libre et le peptide Phe-Leu ; l'existence vraisemblable de peptides à phénylalanine à caractère basique, non éluables dans les conditions expérimentales décrites précédemment, nous a incité à séparer sélectivement ce type de peptides sur des colonnes de charbon activé.

Ce type de fractionnement permet de rassembler dans l'éluat, tous les peptides à caractère aromatique. Après concentration de l'éluat, les peptides sont séparés par électrochromatographie sur papier Whatman n° I (60 x 60 cm). La séparation, en première dimension, est réalisée par électrophorèse à pH 3,9 et la seconde, en chromatographie dans le système butanol/acide acétique.

Le Tableau X rassemble les résultats que nous avons obtenus.

Ces résultats permettent d'établir les séquences suivantes :

| | | |
|----------------|---|-------------------|
| C _c | \ | Dia-(Dia,Phe) |
| G _o | | Phe-(Leu,Dia) |
| D _c | | Phe-(Leu,Dia,Dia) |

Dia- Dia-Phe- Leu-Dia-Dia
(séquence 4)

DISCUSSION

La séquence 4 confirme des enchaînements déjà trouvés dans la séquence 3

3 Phe - Leu - Dia - Dia - Thr

4 Dia - Dia - Phe - Leu - Dia - Dia

Dia - Dia - Phe - Leu - Dia - Dia - Thr
(séquence 5)

TABLEAU X

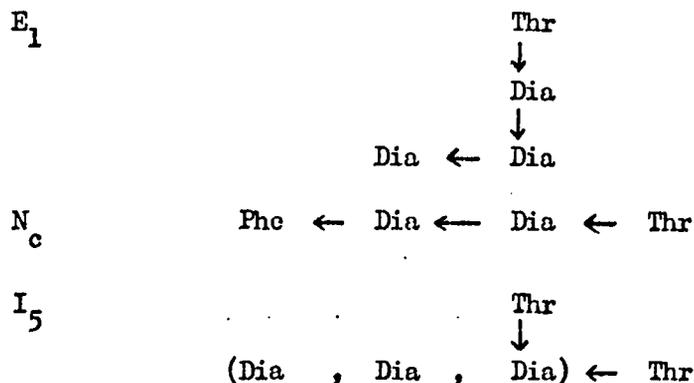
Peptides isolés par chromatographie sur charbon

| Peptides | Composition | Amino-acide N-terminal | Séquence |
|----------|----------------------------------|---------------------------|------------------------|
| Ac | 1 Thr 3 Dia 1 Phe 1 Leu | - | - |
| Cc | 2 Dia 1 Phe | di-DNP-Dia | Dia (Dia, Phe) |
| Dc | 2 Dia 1 Phe 1 Leu | DNP Phe | Phe (Leu, Dia, Dia) |
| Gc | 1 Dia 1 Phe 1 Leu | DNP Phe | Phe (Leu, Dia) |
| Nc | 2 Dia 1 Thr 1 Phe | DNP Thr | Thr (Dia, Dia) Phe (*) |

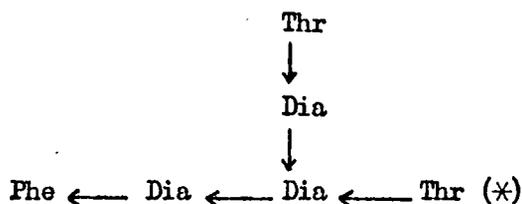
(*) L'extrémité C-terminalo de ce peptide a, en outre, été déterminée par la méthode de TURNER.

Cette séquence 5 situe la position de la phénylalanine dans la molécule de polymyxine

B. D'autre part, on peut rassembler les peptides contenant de la thréonine et provenant des deux types de fractionnement :



d'où la séquence 6 :



L'assemblage des séquences 5 et 6 peut être envisagé de deux manières (Schéma V).

4 - DISCUSSION SUR LA STRUCTURE DE LA POLYMYXINE B

Sur ces deux structures, le raccordement de la séquence I (Ipel-Dia) ne peut se faire que sur le groupe α -aminé de la thréonine extracyclique, par l'intermédiaire du groupe α -carboxylique de l'acide α, γ -diaminobutyrique du composé H_1 .

Les séquences étudiées à l'aide des différents peptides isolés ne nous permettent pas de choisir entre les deux formules heptacyclopeptidiques ou octocyclopeptidiques. Le peptide A_c du Tableau X pourrait peut-être résoudre le problème ; la thréonine de ce peptide peut être, soit celle du cycle, soit celle qui se trouve en position extracyclique dans les formules I et II. Les trois formules suivantes sont,

(*) Les flèches schématisent la liaison peptidique dans le sens CO \longrightarrow NH.

S C H E M A V

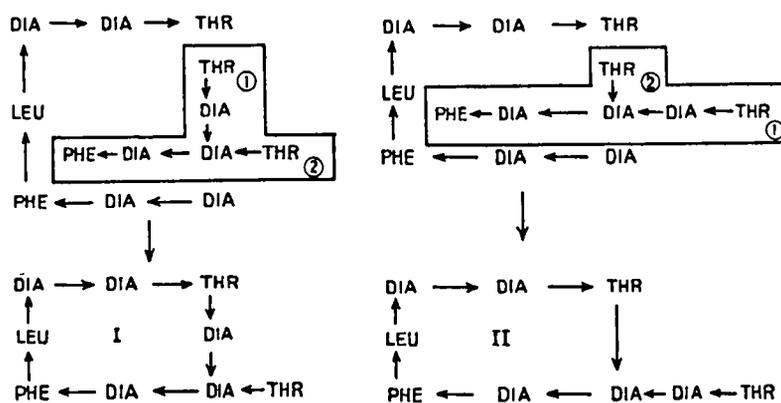
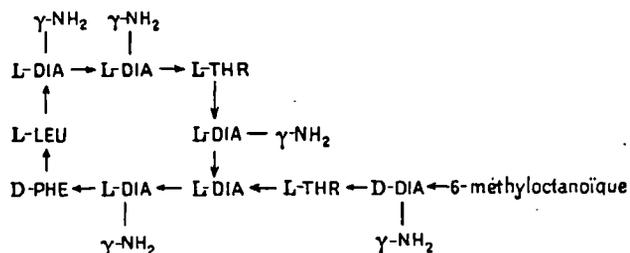
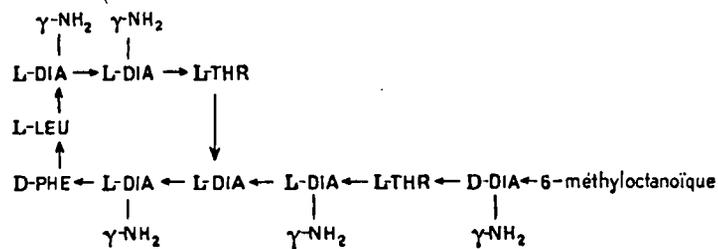


SCHÉMA 1.



Formule I.



Formule II.

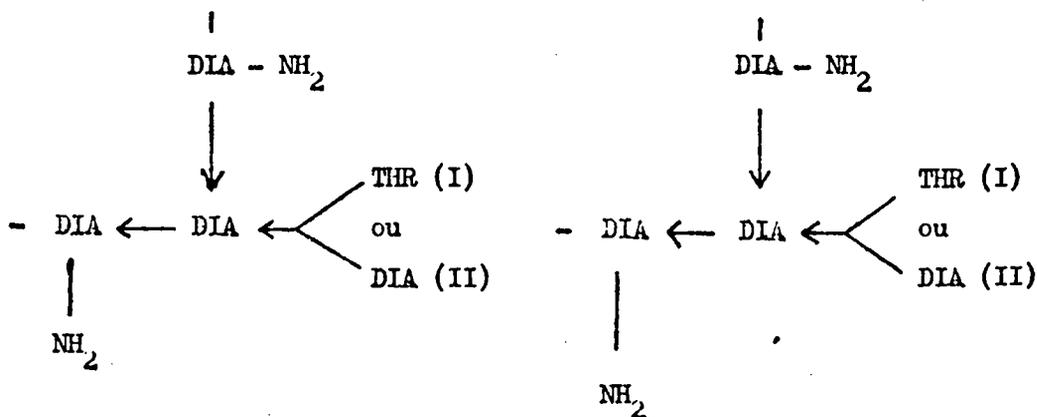
SCHÉMA 2.

en effet, possibles pour ce peptide :

- 1) THR - DIA - DIA - DIA - PHE - LEU
- 2) DIA - THR - DIA - DIA - PHE - LEU
- 3) THR - DIA - DIA - PHE - LEU - DIA

Le problème ne pourrait être tranché que si l'acide α, γ -diaminobutyrique en position N-terminale dans la formule 2 était de la forme D : la structure 1 serait alors exacte. La quantité insuffisante du peptide A_c ne nous a pas permis d'effectuer cette vérification. Il faut d'ailleurs considérer comme HAUSMANN que cette possibilité de coupure est peu vraisemblable, étant donné la facilité d'hydrolyse des liaisons du type thréonine. Dans les peptides que nous avons isolés, la thréonine occupait toujours une position terminale, le plus souvent N-terminale. Dans ces conditions, le peptide A_c possède vraisemblablement la structure 1 ou 3, structures qui ne permettent pas de résoudre le problème.

Dans l'établissement de la formule de la polymyxine B, il reste, d'autre part, un point délicat à établir, qui est celui du type de liaison peptidique au niveau du branchement sur l'acide α, γ -diaminobutyrique qui forme charnière. La chaîne peptidique latérale peut, en effet, être greffée soit sur le groupe α -aminé, soit sur le groupe γ -aminé de cet acide α, γ -diaminobutyrique :



Ce problème ne pourrait être résolu que partiellement, par détermination de la nature des acides diaminobutyriques monodinitrophénylés (type α -DNP ou

γ -DNP) provenant des peptides non ramifiés de l'hydrolysats partiel de la polymyxine (notamment E₁ et N_c) : deux éventualités seront possibles, en faveur soit des structures I et IIa, soit des structures Ia et II.

Nous avons pensé que des arguments permettant de donner la préférence à l'une ou l'autre de ces structures pouvaient être fournis par la construction des modèles moléculaires (*) (Fig. 2I).

Dans la construction des formules I, Ia et IIa, on obtient le nombre maximum de liaisons hydrogène, soit 10 ; avec la formule II, on ne trouve que 9 liaisons hydrogène possibles. D'autre part, avec les formules Ia et IIa, la chaîne latérale continue parfaitement la spirale amorcée dans le cycle, qui est fermé dans ce cas, par une liaison "secondaire" du type γ -peptidique.

Il ne semble donc pas que la construction des modèles puisse conduire à une conclusion ferme. Il est intéressant de signaler, à cet égard, que tous les cyclopeptides actuellement connus (Bacitracine A, Gramicidine S, Tyrocidines A et B), contiennent dans leur cycle un nombre pair d'acides aminés.

Les séquences que nous avons établies (I39) concordent parfaitement avec celles que HAUSMANN (I40) a publiées simultanément. Les conditions d'hydrolyse utilisées par cet auteur n'étaient cependant pas les mêmes que les nôtres : l'hydrolyse était effectuée sur la DNP-polymyxine par l'acide chlorhydrique 6 N à 80°C, pendant 6 heures. Les méthodes de séparation étaient également différentes : dialyses multiples et distribution à contre-courant. Malgré ces différences de technique, la plupart des peptides qui nous ont servi à établir la séquence, ont été également isolés par HAUSMANN, sous forme de dérivés γ -dinitrophénylés ; le tableau XI montre les correspondances entre les peptides isolés de part et d'autre.

L'ensemble des résultats obtenus par HAUSMANN ne permet pas non plus de choisir entre les deux formules.

(*) Modèles S.A.S.M., 99, rue Oberkampf, Paris (XIème).

Figure 2I



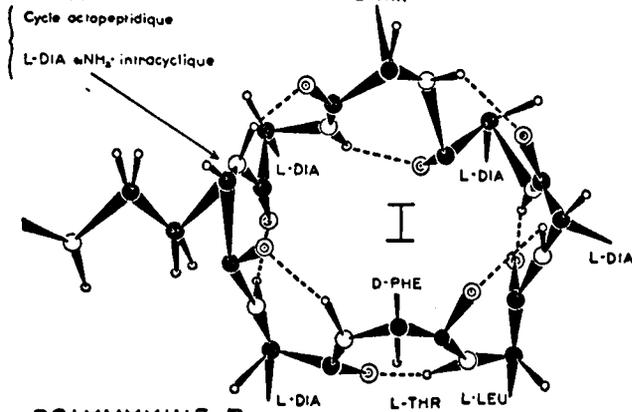
Légende au verso

Figure 2I

Représentation schématique des modèles moléculaires des formules
proposées (I, Ia, II, IIa)

Les liaisons hydrogènes sont figurées par les traits en pointillé.
A noter, sur les formules Ia et IIa, la continuation au niveau de
la chaîne latérale de la spirale amorcée dans le cycle.

POLYMYXINE B₁



POLYMYXINE B₂

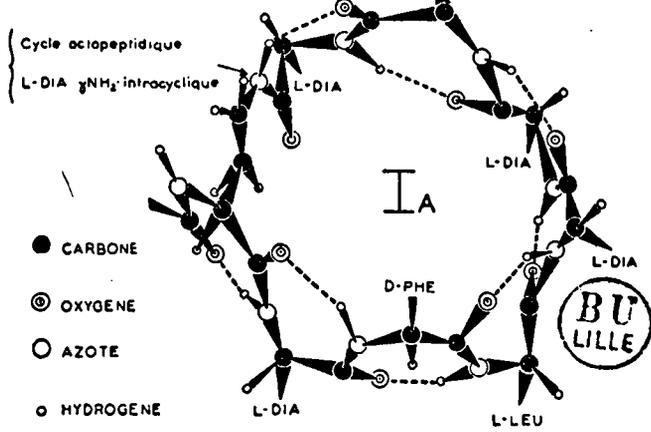


Figure 2I (Suite)

Légende au verso

Figure 2I

Représentation schématique des modèles moléculaires des formules
proposées (I, Ia, II, IIa)

Les liaisons hydrogènes sont figurées par les traits en pointillé.
A noter, sur les formules Ia et IIa, la continuation au niveau de
la chaîne latérale de la spirale amorcée dans le cycle.

POLYMYXINE B.

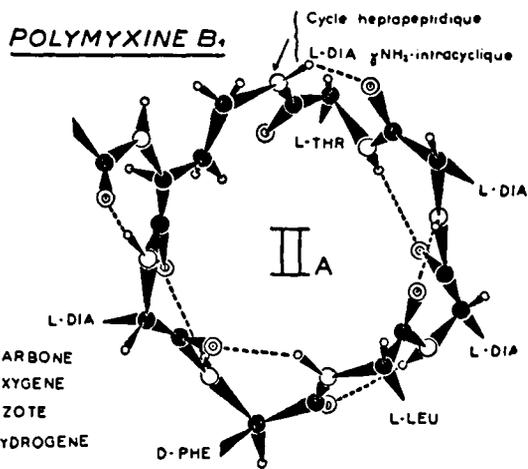
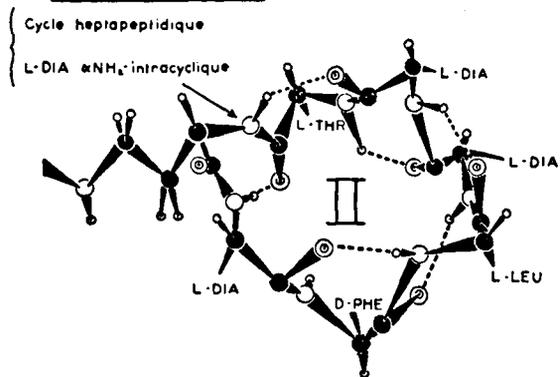


TABLEAU XI

| Hydrolyse partielle de la polymyxine B par HCl 11,2 N à 37°C pendant 6 jours | | Hydrolyse partielle de la DNP-polymyxine B ₁ par HCl 6 N à 80°C pendant 6 heures (HAUSMANN) | |
|---|------------------------------------|---|--|
| H | IPel-Dia σ-NH ₂ | I | Ipel-Dia σ-DNP |
| J | Phe-Leu | I4 | Phe-Leu |
| K | Leu-Dia | 6 | Leu-Dia σ-DNP |
| D _c | Phe - (Leu, Dia, Dia) | 3 | Phe-Leu-Dia-Dia σ-DNP σ-DNP |
| N _c | Thr-Dia-Dia-Phe | 10 | Thr-Dia-Dia-Phe σ-DNP σ-DNP |

C O N C L U S I O N

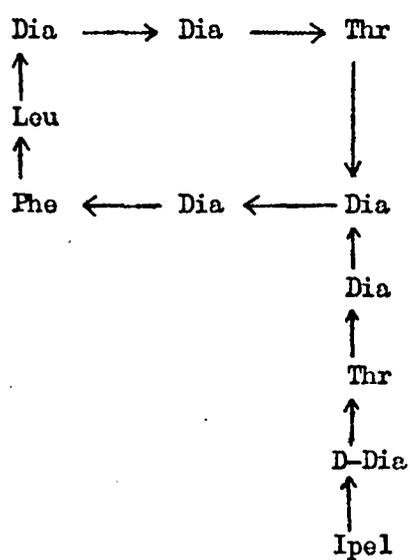
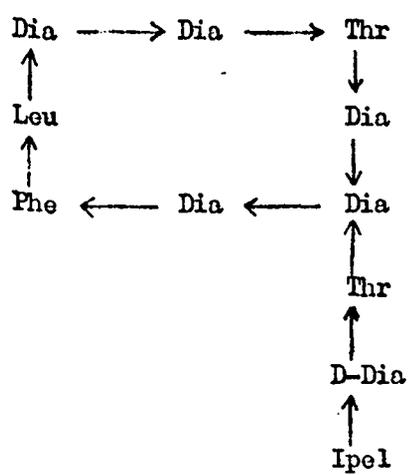
La polymyxine B est un décapeptide hétéromérique, composé de 1 molécule de D-phénylalanine, 1 molécule de L-leucine, 2 molécules de L-thréonine, 6 molécules d'acide α, γ -diaminobutyrique (5 de la forme L, 1 de la forme D) et 1 molécule d'acide gras, l'acide (+) 6-méthyl-octanoïque.

Dans ce travail, la séquence peptidique de la polymyxine B a été étudiée à partir des hydrolysats partiels acides. Les peptides formés ont été séparés par chromatographie sur résine à échange de cations fortement acide (Dowex 50 x 4), puis purifiés par électrochromatographie. Les peptides contenant de la phénylalanine ont été isolés séparément par chromatographie sur charbon et fractionnés par électrochromatographie.

L'étude des différents peptides, ainsi que la constatation de l'absence de groupements α -carboxyliques et α -aminés libres, nous ont permis d'envisager une structure cyclopeptidique, portant une chaîne latérale peptidique branchée sur un résidu d'acide α, γ -diaminobutyrique. Le groupement α -aminé de l'acide D- α, γ -diaminobutyrique qui termine cette chaîne latérale est uni au groupement carboxylique de l'acide isopélargonique.

Nos résultats ne nous permettent cependant pas de choisir entre les deux formules que nous proposons (Voir page 101).

Ce travail nous a, en outre, donné l'occasion de préciser un certain nombre de techniques utilisées pour la détermination des séquences peptidiques. Nous avons pu ainsi étudier les modalités d'application des méthodes d'étude des acides aminés terminaux, notamment la méthode des dinitrophénylamino-acides de SANGER et la



Structure octo-cyclopeptidique

Structure hepta-cyclopeptidique

méthode des thiohydantoïnes. Le problème délicat du fractionnement des peptides a, également, retenu toute notre attention : nous avons ainsi été amené à préciser plus particulièrement les conditions d'utilisation des échangeurs d'ions et de l'électrochromatographie.

L'étude de la colimycine que nous avons entreprise, nous permettra de poursuivre ce travail sur la structure des polypeptides bactériens du groupe des polymyxines.

—oooOooo—

B I B L I O G R A P H I E

Les références bibliographiques sont données dans l'ordre alphabétique de leurs auteurs. Les numéros entre parenthèses indiquent l'ordre d'apparition dans le texte.

ACHER R. et LAURILA U.R.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 413 (85).

AINSWORTH G.C., BROWN A.M. et BROWNLEE G.

Nature, 1947, 160, 263 (4).

BATTERSBY A.R. et CRAIG L.C.

J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1887-1952, 74, 4023 (39,41).

BELL P.H., BONE J.F., ENGLISH J.P., FELLOWS C.E., HOWARD K.S., ROGERS M.M., SHEPHERD R.G., WINTERBOTTOM R., DORMBUSH A.C., KUSHNER S. et SUBBA ROW Y.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 897 (21, 27, 32, 37, 43, 56, 58, 62, 93).

BENEDICT R.G. et LANGLYKKE A.F.,

J. Bact., 1947, 54, 24 (2).

BERGEY

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
6th Ed., 1948 (WILLIAMS and WILKINS, editors. Baltimore). (5)

BERGMANN M. et FRUTON J.S.

J. Biol. Chem., 1937, 117, 189-1937, 118, 405 (101).

BERGMANN M. et ROSS W.F.

J. Am. Chem. Soc., 1936, 58, 1503 (100).

BISERTE G.

Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 416 (I04).

BISERTE G. et DAUTREVAUX M.

2^e ede Colloquium Brugge 1954, p.9 (Editions ARSCIA - Bruxelles).(I36).

C.R. Acad. Sci., 1956, 243, 923.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, 795 (I39).

BISERTE G. et OSTEUX R.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 33, 50 (87).

BOULANGER P. et OSTEUX R.

Cancérologie (Lille), 1954, 2, 277, (55).

BROWNLEE G. et BUSHBY S.R.M.

Lancet, 1947, 254, I27 (6, I5).

CATCH J.R. et JONES T.S.G.

Biochem. J., 1948, 42, LI (45).

CATCH J.R., JONES T.S.G. et WILKINSON S.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 917 (9, I8, 26, 29, 65).

CHIBNALL A.C. et REES M.W.

Biochem. J., 1951, 48, XVII - 1952, 52, III (77).

CONSDEN R., GORDON A.H. et MARTIN A.J.P.

Biochem. J., 1944, 38, 224 - 1947, 41, 590 (50, I18).

CONSDEN R., GORDON A.H., MARTIN A.J.P. et SYNGE R.L.M.

Biochem. J., 1947, 41, 596 (I32, I94).

CRAIG L.C.

J. Biol. Chem., 1944, I55, 519 (40, I05).

Antibiotics polypeptides - 3e Congrès International de Biochimie,
Bruxelles, 1955. Rapports p. 21 (Imp. H. VAILLANT-CARMANNE, Liège) (67).

CRAIG L.C. et HAUSMANN W.

Analytical Chem., 1951, 23, 1236 (40).

DAKIN H.D. et WEST R.

J. Biol. Chem., 1928, 78, 91 - 1928, 78, 745 (135).

DAUTREVAUX M. et BISERTE G.

C.R. Acad. Sci., 1955, 240, 1153 (81, 90) - 1956, 242, 1801 (139).

DAVIES C.W.

Biochem. J., 1949, 45, 38 (110).

DENT C.E.

Biochem. J., 1948, 43, 169 (119).

DESNUELLE P. et BONJOUR G.

Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 451 (98).

DESNUELLE P. et CASAL A.

Biochim. Biophys. Acta, 1948, 2, 48 (96).

DOWLING J.H., KOFFLER H., REITZ H.C., PETERSON D.H. et TETRAULT P.A.

Science, 1952, 116, 147 (22, 24).

DUBOS R.J. et CATTANEO C.

J. Exptl. Med., 1939, 70, 249 (1).

DUMAZERT C. et BOZZI-TICHADOU M.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 169 (120)

DURRUM E.L.

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2943 (103).

EDMAN P.

Acta Chem. Scand., 1950, 4, 283 (72).

FEW A.V. et SCHULMAN J.H.

Biochem. J., 1953, 54, 171.(44).

FRAENKEL-CONRAT H.

J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 3606.(89)

FRAENKEL-CONRAT H., HARRIS J.I. et LEVY A.L.

Peptides and Proteins, in METHODS of BIOCHEMICAL ANALYSIS, 1955, tome 2, p. 359-425 (INTERSCIENCE, Publishers New-York).(131)

FROMMAGEOT C., JUTISZ M. et LEDERER E.

Biochim. Biophys. Acta, 1948, 2, 487. (117,128)

FROMMAGEOT C., JUTISZ M., MEYER D. et PENASSE L.

Biochim. Biophys. Acta, 1950, 6, 283. (76).

GORE R.C. et PETERSEN E.M.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 924. (63)

GRASSMANN W., HANNIG K. et FLOCKL M.

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1955, 299, 258. (49,52,61,123)

GROTE I.W.

J. Biol. Chem., 1931, 25, 93. (91)

HANES C.S., HIRD F.J.R. et ISHERWOOD F.A.

Biochem. J., 1952, 51, 25. (129)

HAUSMANN W.

J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 3663. (92, 140)

HAUSMANN W. et CRAIG L.C.

J. Biol. Chem., 1952, 198, 405.(42,60)
J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4892.(25,31,38,53,57)

HIRS C.W.H., MOORE S. et STEIN W.H.

J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1893. (106,116)

J. Biol. Chem., 1952, 195, 669. (114,125)

J. Biol. Chem., 1956, 219, 623. (107,124).

JONES T.S.G.

Biochem. J., 1948, 42, XXXV - 1948, 43, XXVI. (45)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 909. (13,34,36).

KAUFMANN H.P. et NITSCH W.M.

Fette und Seifen, 1954, 56, 154. (138)

LANDMANN W.A.

J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 3638. (74)

LENS J.

Biochim. Biophys. Acta, 1949, 3, 367. (70)

LEVY A.L.

Nature, 1954, 174, 126. (53,88)

LI Ch., GESCHWIND I.I., COLE R.D., RAACKE I.D., HARRIS J.I. et DIXON J.S.

Nature, 1955, 176, 687. (121)

MACHEBOEUF M., DUBERT J.M. et REBEYROTTE P.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 37, 346. (122)

Mac LEOD C.M.

J. Bact., 1948, 56, 749. (8)

MARTIN A.J.P. et SYNGE R.L.M.

Biochem. J., 1941, 35, 1358. (101)

MILLS G.L.

Biochem. J., 1952, 50, 707. (86)

MOORE S. et STEIN W.H.

J. Biol. Chem., 1948, 176, 367. (51)
Cold Spring Harbor Symposia, 1950, XIV, 179. (112,113)
J. Biol. Chem., 1951, 192, 663. (115,126)

MURRAY F.J., TETRAULT P.A., KAUFMANN O.W., KOFFLER R., PETERSON D.H. et COLINGS-
WORTH D.H.

J. Bact., 1948, 57, 305. (7)

NASH H.A. et SMASKEY A.R.

Arch. of Biochem., 1951, 30, 237. (23)

PARTRIDGE S.M.

Biochem. J., 1948, 42, 238.(47,48)

Nature, 1952, 169, 496. (108)

PARTRIDGE S.M. et BRIMLEY R.G.

Biochem. J., 1951, 48, 313 - 1951, 49, 153. (III)

PARTRIDGE S.M. et DAVID H.F.

Nature, 1950, 165, 62. (97)

PARTRIDGE S.M., WESTALL R.G. et BENDALL J.R.

Nature, 1947, 160, 374. (109)

PETERSON D.M. et REINECKE L.M.

J. Biol. Chem., 1949, 181, 95. (19,28,33,35,59)

PORTER J.N., BROSDHARD R., KRUPKA G., LITTLE P. et ZELLAT J.S.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 857 (II,14,16)

PORTER R.R. et SANGER F.

Biochem. J., 1948, 42, 287.(84)

REGNA P.P., SOLOMONS I.A., FORSCHER B.K. et TIMRECK A.E.

J. Clin. Invest., 1949, 27, 1022. (30)

ROVERY M., FABRE C. et DESNUELLE P.

Biochim. Biophys. Acta, 1953, 12, 547. (83)

SANGER F.

Biochem. J., 1945, 39, 507. (68)
1945, 39, 507 - 1949, 45, 563 - 1953, 53, 353. (54,71)
1953, 53, 353. (137)

SANGER F. et TUPPY H.

Biochem. J., 1951, 49, 463. (94)
1951, 49, 481. (99)

SCHLACK P. et KUMPF W.

Z. Physiol. Chem., 1926, 154, 125. (78)

SJOQUIST J.

Acta Chem. Scand., 1953, 7, 447. (73)

STANSLY P.G., SHEPHERD R.G. et WHITE H.J.

Bull. Johns Hopkins Hosp., 1947, 81, 43. (3)

SYNGE R.L.H.

Biochem. J., 1946, 39, 351. (46,95)

THOMPSON A.R.

Biochem. J., 1955, 60, 507. (127)

TIBBS J.

Nature, 1951, 160, 910. (79)

TOENNIES G. et KOLK J.J.

Anal. Chem., 1951, 23, 823. (75)

TURNER R.A. et SCHMENZLER G.

J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 949. (133)

WAKSMAN S.A. et REILLY H.C.

Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1945, 17, 556. (13)

WALDSCHMIDT-LEITZ E.

Z. Physiol. Chem., 1956, 304, 166. (69)

WALEY S.G. et WATSON J.

J. Chem. Soc., 1951, 2394. (80)

WIELAND Th.

Angew. Chem., 1948, 60, 313

Naturwiss., 1948, 35, 29. (102)

WILKINSON S.

Nature, 1949, 164, 622. (64)

Brit. Med. Bull., 1950, 645, 750. (20)

Brit. Med. Bull., 1951, 658, 766. (17)

YASUO KOYAMA

Japan Brevet n° 1546. (52) et Chemical Abstracts, 1953, 47, 6097g. (10)

—ooCoo—

TABLE DES MATIERES

| | <u>Pages</u> |
|--|--------------|
| INTRODUCTION | I |
| <u>CHAPITRE I - HISTORIQUE</u> | 2 |
| <u>CHAPITRE II - PRODUCTION, ISOLEMENT ET PURIFICATION DES POLYMYXINES</u> | |
| A - PRODUCTION ET ISOLEMENT | 5 |
| B - PURIFICATION | |
| 1 - Cristallisation | 6 |
| 2 - Chromatographie de partage sur colonnes | 6 |
| 3 - Chromatographie de partage sur papier | 9 |
| 4 - Distribution à contre-courant | 9 |
| <u>CHAPITRE III - PROPRIETES PHYSIQUES</u> | |
| A - Solubilité | 12 |
| B - Pouvoir rotatoire | 13 |
| C - Courbes de titration | 13 |
| D - Spectre ultra-violet | 15 |
| E - Poids moléculaire | 15 |

CHAPITRE IV - COMPOSITION DES POLYMYXINES

A - LES AMINO-ACIDES

I - Techniques expérimentales utilisées

| | |
|--|----|
| a) Hydrolyse totale | 20 |
| b) Identification | 21 |
| c) Dosage : Méthode de GRASSMANN et HANNIG | 23 |
| Méthode de LEVY | 24 |

| | |
|---------------------|----|
| 2 - Résultats | 25 |
|---------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| B - L'ACIDE GRAS | 28 |
|------------------------|----|

CHAPITRE V - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE LA POLYMYXINE B

| | |
|---|----|
| A - ETUDE DES ACIDES AMINES TERMINAUX | 30 |
|---|----|

I - Principe des méthodes

| | |
|--------------------------------|----|
| a) Méthodes enzymatiques | 31 |
|--------------------------------|----|

b) Méthodes chimiques

α) Extrémités N-terminales

| | |
|-----------------------------|----|
| 1 - Méthode de SANGER | 31 |
|-----------------------------|----|

| | |
|----------------------------|----|
| 2 - Méthode de EDMAN | 32 |
|----------------------------|----|

β) Extrémités C-terminales

| | |
|----------------------------------|----|
| 1 - Méthodes par réduction | 32 |
|----------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| 2 - Méthode des thiohydantoïnes | 34 |
|---------------------------------------|----|

2 - Partie expérimentale

| | |
|----------------------------|----|
| a) Méthode de SANGER | 35 |
|----------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------|----|
| β) Méthode des thionydantoïnes | 41 |
|--------------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 3 - Acides aminés terminaux des polymyxines | 42 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| B - ETUDE DE L'ENCHAÎNEMENT PEPTIDIQUE | 46 |
|--|----|

I - Hydrolyse partielle

a) Principe des méthodes

| | |
|------------------------------------|----|
| α) Hydrolyse partielle acide | 47 |
|------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| β) Hydrolyse enzymatique | 48 |
|--------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------|----|
| b) Application à la polymyxine | 49 |
|--------------------------------------|----|

2 - Fractionnement des peptides

a) Principe des méthodes de fractionnement

α) Techniques primaires

| | |
|--------------------------------------|----|
| 1 - Chromatographie de partage | 56 |
|--------------------------------------|----|

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2 - Electrophorèse sur papier | 57 |
|-------------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 3 - Distribution à contre-courant | 57 |
|---|----|

4 - Echange d'ions

| | |
|--------------------------------------|----|
| - Les résines à échange d'ions | 58 |
|--------------------------------------|----|

- Fonctionnement des résines

| | |
|----------------------------|----|
| Réacteur d'équilibre | 60 |
|----------------------------|----|

| | |
|--|----|
| Facteurs de l'équilibre (concentra- tions, température, pH,) | 61 |
|--|----|

| | <u>Pages</u> |
|---|--------------|
| - Applications des résines | |
| Dessalage des solutions d'acides aminés... | 64 |
| Analyse par déplacement | |
| par élution | 65 |
| β) Techniques secondaires | 66 |
| b) Techniques expérimentales appliquées à la polymyxine B | |
| α) Chromatographie sur papier | 67 |
| β) Electrophorèse sur papier | 68 |
| γ) Chromatographie sur Dowex 50 | |
| Préparation de la résine | 69 |
| Préparation de la colonne | 69 |
| Elution des peptides | 70 |
| δ) Fractionnement sur charbon | 75 |
| 3 - Etude des peptides | |
| a) Contrôles de pureté | 76 |
| b) Principe des méthodes d'étude des petits peptides | |
| Méthode par désamination | 78 |
| Méthode de TURNER | 79 |
| c) Techniques expérimentales | |
| α) Méthode de SANGER | 79 |
| β) Méthode à la carboxypeptidase | 80 |
| γ) Méthode de TURNER | 80 |
| d) Résultats fournis par l'étude de la polymyxine B | |
| α) Hydrolysats partiels de DNP-polymyxine | 80 |
| β) Peptides isolés par chromatographie sur Dowex 50 ... | 83 |
| γ) Peptides isolés par chromatographie sur charbon | 89 |
| 4 - DISCUSSION sur la structure de la polymyxine B | 91 |
| CONCLUSIONS | 100 |
| BIBLIOGRAPHIE GENERALE | 103 |

—ooOoo—

