

SÉPARATION DES ACIDES AMINÉS DES MILIEUX BIOLOGIQUES COMPLEXES

V. DESCRIPTION D'UN COUPLAGE DE MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ÉLECTROPHORÉTIQUES*

GÉRARD BISERTE, THÉRÈSE PLAQUET-SCHOONAËRT,
PAUL BOULANGER ET PIERRE PAYSANT

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lille (France)

(Reçu le 26 mars 1959)

L'application de la chromatographie de partage sur papier à l'étude des acides aminés libres ou combinés des milieux biologiques a déjà fourni des résultats remarquables. Toutefois, l'emploi continu de cette méthode depuis plus de dix ans nous a permis de définir exactement ses possibilités, mais en même temps de préciser certains inconvénients et de faire quelques réserves: l'apparition fréquente, dans la littérature, de nouveaux systèmes-solvants montre d'ailleurs bien que la satisfaction n'est pas totale!

A. REVUE CRITIQUE DES POSSIBILITÉS SÉPARATIVES DE LA CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE

1. Couplage butanol-acide acétique et phénol aqueux

Le type de chromatographie bidimensionnelle le plus employé est réalisé en première dimension avec le solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5) (PARTRIDGE³⁶) et en seconde dimension avec le phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale (CONSDEN *et al.*⁷) ou le phénol tamponné à pH 9.3 (LEVY ET CHUNG²⁷). Avec ces solvants, la séparation des acides aminés d'un hydrolysât total de protéine est satisfaisante à condition que l'acide chlorhydrique soit complètement éliminé (voir la carte de PARRY³⁵). Toutefois, la séparation de la sérine et du glycocole, ainsi que celle de la leucine et de la phénylalanine ne sont pas complètes, et ceci constitue un inconvénient majeur pour le dosage chromatographique des acides aminés. D'autre part, la valine et la méthionine occupent exactement la même position, et l'artifice qui consiste à transformer la méthionine en méthionine-sulfone et (ou) en méthionine-sulfoxyde (DENT⁹) n'est pas toujours d'une application commode, car il y a très souvent dans les solutions étudiées une faible proportion de méthionine par rapport à la valine et l'identification est donc malaisée. De même, la caractérisation de la cystine n'est pas

* Pour les mémoires antérieurs, voir références^{3, 4, 6}.

toujours facile: il est indispensable d'effectuer un second chromatogramme après oxydation* et de repérer alors l'acide cystéique.

L'interprétation des chromatogrammes bidimensionnels des fractions aminoacides des milieux biologiques (tissus animaux et végétaux, sérum, urine, etc.) est encore plus délicate et pose des problèmes particuliers très difficiles à résoudre (Fig. 1).

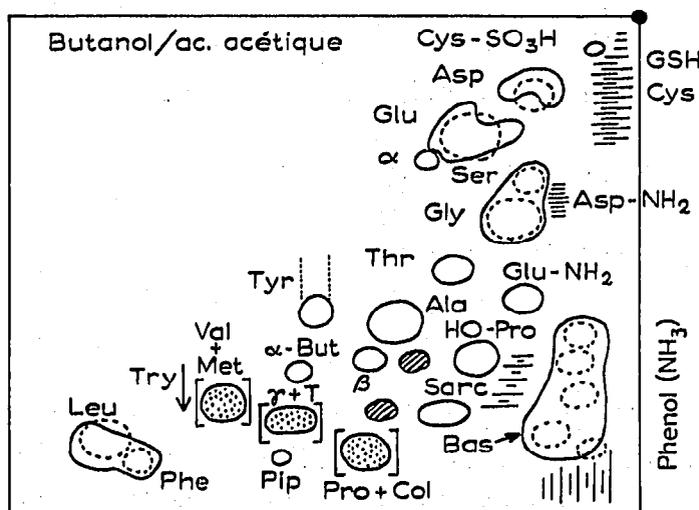


Fig. 1. Schématisation des principales difficultés rencontrées au cours de la chromatographie bidimensionnelle des acides aminés des milieux complexes. (Chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) en première dimension et phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale en seconde dimension.) Les cercles pointillés figurent l'emplacement théorique des acides aminés. Les surfaces entourées d'un trait plein correspondent aux positions habituellement observées au cours de l'étude d'un milieu biologique complexe. Les zones hachurées indiquent l'emplacement des plages "ninhydrine positive" d'interprétation délicate. Les surfaces ponctuées et entourées de parenthèses représentent des régions de chevauchement d'acides aminés. Dans la région de la proline (bien que la coloration jaune de cet aminoacide avec le réactif à la ninhydrine soit assez caractéristique) il est souvent difficile de conclure à la présence de la colamine. Les deux surfaces hachurées indiquent la position de la β -alanine et de l'acide γ -aminobutyrique dans un hydrolysats total de milieu biologique (l'acide chlorhydrique ayant été éliminé simplement par évaporation sous vide). Les abréviations suivantes ont été utilisées: Cys-SO₃H = acide cystéique; Asp = acide aspartique; Glu = acide glutamique; α = acide α -aminoadipique; Ser = sérine; Gly = glycofolle; Asp-NH₂ = asparagine; Glu-NH₂ = glutamine; Thr = thréonine; Tyr = tyrosine (lorsque la tyrosine se trouve à une concentration élevée, elle a une tendance à traîner); Ala = alanine; β = β -alanine; HO-Pro = hydroxyproline; Sarc = sarcosine; Bas = acides aminés basiques (ornithine, histidine, lysine, méthylhistidine) + ansérine + carnosine; Pro = proline; Col = colamine; Pip = acide pipécolique; Phe = phénylalanine; Leu = leucines; Try = tryptophane; Val = valine; Met = méthionine; γ = acide γ -aminobutyrique; T = acide β -aminoisobutyrique ou T-spot; α -But = acide α -aminobutyrique.

En effet, malgré une déminéralisation soignée, la région du chromatogramme occupée par les acides diaminés est généralement confuse. Elle se présente très souvent sous la forme d'une traînée dans laquelle la séparation de l'arginine, de la lysine et de l'histidine est imprécise. Cette observation est particulièrement nette dans le cas des urines qui contiennent une très forte proportion d'histidine et dans lesquelles peut se trouver un taux élevé de méthylhistidine, ainsi que de l'ansérine et de la carnosine, qui viennent se placer dans la même zone.

* L'oxydation performique de l'hydrolysats total (SCHRAM *et al.*⁴³) est préférable à l'oxydation par l'eau oxygénée à 110 volumes des substances déposées à la tache de départ.

Sur les chromatogrammes, certaines amines biologiques forment au-dessous de la zone des acides diamminés une tache confuse qu'il est difficile de décomposer exactement. On peut trouver dans ce groupe la β -mercaptoéthylamine.

De faibles quantités d'asparagine ne peuvent être décelées facilement sur les chromatogrammes bidimensionnels, car cette substance donne avec la ninhydrine une tache de coloration brunâtre qui vient se juxtaposer au groupe sérine-glycocolle. La taurine se place également au niveau de cette zone. Si les milieux biologiques n'ont pas été fractionnés sur une résine à échange de cations fortement acide (Dowex 50 ou Amberlite IR 120), qui retient tous les acides aminés mais ne fixe pas la taurine (BOULANGER, BISERTE ET COURTOT⁶), celle-ci ne peut être aisément identifiée.

Il est aussi difficile de distinguer nettement la cystine et le glutathion. Les différences de R_F sont minimales et le glutathion a tendance à traîner. Pour identifier le glutathion, il est indispensable d'éluer très exactement la région correspondante (sans déborder sur la tache de l'acide glutamique et du glycocolle), d'hydrolyser totalement l'éluat et de chromatographier l'hydrolysât: la présence de cystine, d'acide glutamique et de glycocolle permet de conclure à la présence de glutathion.

D'autre part, l'acide γ -aminobutyrique se place très près de l'acide β -aminoisobutyrique (ou T-spot) et la séparation est peu satisfaisante.

La distinction entre l'acide δ -aminovalérique et la valine est également délicate. Elle est possible avec des solutions témoins équimoléculaires, mais, dans le cas des milieux biologiques, où il y a souvent une disproportion très marquée entre les taux des deux substances, l'identification est souvent impossible.

La plupart des inconvénients que nous venons de signaler se retrouvent dans le couplage butanol-acide acétique et *m*-crésol-phénol tamponné à pH 9.3 (LEVY ET CHUNG²⁷).

2. Autres couplages bidimensionnels

(a) *Système collidine-phénol*. Des difficultés comparables aux précédentes s'observent également avec le système collidine-phénol (voir DENT⁹)*. De plus, la variabilité de composition de la collidine, la sensibilité de ce système-solvant aux variations de la température, constituent des inconvénients supplémentaires. Avec ce couplage, la région des acides diamminés est toujours très complexe, d'autant plus que l'acide γ -aminobutyrique et l'acide δ -aminovalérique viennent également s'y placer. L'arginine n'est pas séparée nettement de la lysine. Au contraire, la méthylhistidine et l'histidine sont mieux isolées du groupe des acides aminés basiques; mais la méthylhistidine occupe une position voisine de la proline. La taurine est bien séparée du groupe sérine-asparagine-glycocolle.

(b) *Autres systèmes-solvants*. Dans les couplages butanol-acide acétique + phénol et collidine + phénol, les R_F des acides diamminés sont très nettement différents de ceux des acides dicarboxyliques (R_F bas des acides dicarboxyliques dans tous les

* La collidine peut être remplacée par le système alcool benzylique-acide acétique-eau (50:10:13) (SEN ET BURMA⁴⁴).

solvants; R_F bas des acides diaminés dans le butanol-acide acétique et la collidine, élevés dans le phénol). Dans de nombreux autres types de chromatographie bidimensionnelle, cette dissociation ne s'observe pas et les acides diaminés, les acides dicarboxyliques et leurs amides, les acides aminés soufrés et les acides aminés neutres à chaîne courte sont très proches les uns des autres. Par exemple, le couplage méthanol-eau-pyridine (80:20:4) en première dimension et *tert.*-butanol-méthyléthylcétone-eau-diéthylamine (40:40:20:4) en seconde dimension (REDFIELD³⁰) n'est pas applicable à l'étude des milieux biologiques complexes pour cette raison. Pourtant il permet une séparation assez satisfaisante de la méthionine et de la valine. L'acide α -aminobutyrique, l'acide γ -aminobutyrique, l'acide β -aminoisobutyrique et la méthionine ont des R_F très voisins dans le solvant méthanol-eau-pyridine.

La variante technique de BELL et coll.¹ (en première dimension, chromatographie dans le butanol-acide acétique, et en seconde dimension, chromatographie dans le solvant méthanol-eau-pyridine des composés à R_F inférieurs à 0.40 dans le butanol-acide acétique et dans le solvant *tert.*-butanol-méthyléthylcétone-eau-diéthylamine des composés à R_F supérieurs à 0.40) permet une résolution satisfaisante des acides aminés d'un hydrolysats total de protéine (sauf pour l'alanine et la proline), mais elle est difficilement applicable à l'étude des milieux biologiques complexes.

Le couplage *sec.*-butanol-ammoniaque 3% (150:60) en première dimension et *sec.*-butanol-acide formique-eau (150:30:20) en seconde dimension (HAUSSMANN¹⁸) présente les mêmes inconvénients que celui de REDFIELD³⁰.

Les systèmes uniphasiques de HARDY et coll.¹⁵: éthanol-*n*-butanol-acétone-eau-dicyclohexylamine (10:10:5:2), permettent une séparation satisfaisante des acides diaminés, mais ne séparent pas suffisamment le groupe valine-méthionine-tyrosine-leucine-phénylalanine.

En conclusion de cette revue critique, il apparaît que la sélectivité et le pouvoir de résolution des méthodes chromatographiques sont insuffisants pour l'étude précise des milieux biologiques complexes, qui contiennent beaucoup plus de composés donnant une réaction positive à la ninhydrine que les hydrolysats totaux de protéines. Avec tous les couplages chromatographiques décrits, il est relativement facile d'établir la répartition de très nombreux composés: par exemple, certaines cartes indiquent, soit par des points, soit par des cercles, la position de 80 composés "ninhydrine positive"! Quelques expérimentateurs donnent des tableaux des valeurs de R_F avec trois chiffres après le point! Ces données sont trop théoriques et ne peuvent s'appliquer sans risque à une étude pratique, car elles ne tiennent pas compte des problèmes particuliers qui se posent au cours de l'étude de milieux biologiques différents.

B. PRINCIPE DU COUPLAGE PROPOSÉ

Pour essayer d'obtenir des séparations plus satisfaisantes et d'application facile, nous nous sommes efforcés de mettre au point une technique plus sélective. L'originalité du procédé que nous proposons réside essentiellement dans *un couplage de méthodes chromatographiques et électrophorétiques classiques*, qui conserve à l'ensemble

des manipulations leur simplicité et leur commodité. Son principe peut se schématiser de la façon suivante:

- (1) Séparation de base par électrophorèse sur papier en tampon volatil de pH 3.9;
- (2) Couplage bidimensionnel électrophorèse sur papier à pH 3.9 et chromatographie butanol-acide acétique-eau pour la séparation des composés "acides" et la séparation des composés "légèrement basiques";
- (3) Couplage bidimensionnel électrophorèse sur papier à pH 2.4 et chromatographie butanol-acide acétique-eau pour la séparation des composés "neutres";
- (4) Electrophorèse sur papier en tampon volatil de pH 6.5 et de pH 11.7 pour la séparation des composés "basiques".

Les troisième et quatrième étapes peuvent être réalisées à partir du fractionnement de base en électrophorèse sur papier à pH 3.9 grâce à une élution directe et automatique des bandelettes de papier contenant les aminoacides sur une autre feuille d'électrophorèse ou de chromatographie (dispositif d'élution automatique de BISERTE²).

Tous les tampons d'électrophorèse et les solvants chromatographiques employés sont facilement éliminés par ventilation d'air froid ou tiède.

C. APPAREILS ET RÉACTIFS

1. Cuve de chromatographie

Tous les modèles classiques de cuve peuvent être employés. Les cuves à 4 ou 5 godets, en chlorure de polyvinyle, sont d'un prix de revient modique et leur robustesse est très satisfaisante. La température de la chambre à chromatographie doit être stabilisée à $21^{\circ} \pm 1^{\circ}$.

2. Appareils d'électrophorèse

Ce sont tous des appareils en V renversé (type DURRUM⁹) entièrement construits en chlorure de polyvinyle (voir Fig. 2). Deux types d'appareils peuvent être utilisés, l'un

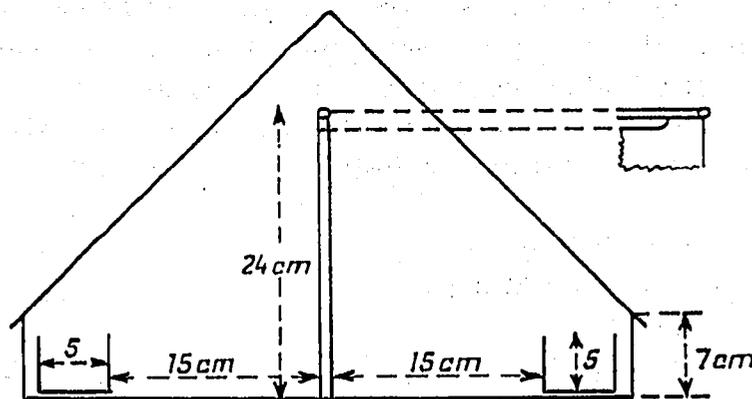


Fig. 2. Appareil d'électrophorèse "en toit" type DURRUM (vue en coupe). La longueur des bacs à tampon est de 68 cm dans les appareils de grandes dimensions et de 32 cm dans les appareils de petites dimensions; les bacs sont indépendants de l'appareil; une électrode en platine est placée directement dans le bac, à l'une de ses extrémités. L'épaisseur des plaques de chlorure de polyvinyle est de 3 mm. La plaque médiane a une épaisseur de 1 cm. A sa partie supérieure, on place une tige de verre qui supporte directement la feuille de papier.

pour des feuilles de 28×40 cm, l'autre pour des feuilles de 46×57 cm. Il est utile (mais non indispensable) de disposer de plusieurs appareils pour éviter de changer constamment les systèmes-tampons.

3. Redresseur de courant

Un redresseur de courant robuste permet d'alimenter plusieurs cuves. Le potentiel peut varier entre 0 et 800 V (ou 1000 V), par fractions de 100 V.

4. Dispositif d'élution automatique

Nous utilisons l'appareil décrit par BISERTE². Le découpage des deux extrémités de la bandelette en pointes, dont l'une est mise au contact de la feuille réceptrice, permet l'élution des acides aminés sous la forme d'une tache de 5 à 6 mm de diamètre. Pour obtenir l'élution sous la forme d'une ligne, pour l'électrophorèse, il suffit de découper la partie inférieure de la bande à éluer pour lui donner la dimension de la ligne de départ désirée. Pour fixer la durée d'élution d'une bandelette de papier, il faut tenir compte de l'épaisseur et de la surface de la bande, de la capacité de la seringue (5, 10 et 20 ml) et de la vitesse de rotation du moteur (1 tour/24 h ou 1 tour/12 h). La variation de vitesse du moteur est facilement obtenue par l'addition d'engrenages supplémentaires. L'élution totale est naturellement contrôlée à la fin de l'opération par pulvérisation de réactif à la ninhydrine sur la bandelette.

5. Formules des tampons

Tampon de pH 3.9: Pyridine-acide acétique-eau (30:100:4870) (MICHL³², GRASSMANN, HANNIG ET PLÖCKL¹⁴). Cette formule nous a donné de meilleurs résultats que celle de KICKHÖFEN ET WESTPHAL²⁵ (tampon pyridine-acide acétique-eau (1:10:89), de pH 3.6). Nous utilisons aussi avec succès la formule pyridine-acide acétique-eau (30:100:3870). Dans ces conditions, la durée de l'électrophorèse peut être raccourcie, car les séparations sont plus rapidement obtenues. Le tampon de pH 3.8 (acide acétique-acétate de sodium, $\mu = 0.05$) préconisé par MONDOVÌ *et al.*³³ permet également un fractionnement de base intéressant, mais il n'est pas volatil.

Tampon de pH 6.5: Pyridine-acide acétique-eau (200:8:1792) (HARRIS, SANGER ET NAUGHTON¹⁶). Ce tampon nous a donné des résultats plus satisfaisants que celui de LOCKHART ET ABRAHAM³⁰ (tampon collidine-acide acétique-eau (36.3:185:3860) de pH 7).

Solution d'ammoniaque N (pH 11.7).

Solution d'acide acétique N (pH 2.4).

6. Réactif à la ninhydrine

Pour les révélations rapides, nous utilisons une solution de ninhydrine à 0.1% dans le *n*-butanol saturé d'eau. Après pulvérisation, les chromatogrammes sont portés à l'étuve à 100° pendant 10 à 15 min.

Pour obtenir une révélation plus satisfaisante, notamment sur le plan quantitatif, nous avons adopté le mode opératoire suivant.

Pour les acides aminés neutres et dicarboxyliques, nous utilisons la formule de BELL et coll.¹: ninhydrine à 1% dans l'acétone (p/v) contenant 10% (v/v) de tampon phosphate 0.05 M de pH 7. Pour les acides aminés basiques, la solution de ninhydrine est à 1% dans l'acétone (p/v) contenant 6% (v/v) d'acide acétique.

Les chromatogrammes sont trempés complètement dans le réactif à la ninhydrine, égouttés et séchés pendant une heure dans une atmosphère privée d'ammoniac, puis portés à l'étuve à 38° pendant 15 h. Pour une estimation semi-quantitative, les surfaces englobant la totalité de la coloration et des surfaces voisines de mêmes dimensions servant de blanc sont découpées dans le papier et éluées par 3 ml d'acétone contenant 25% d'eau, pendant 20 min sous agitation discontinue. Après centrifugation, les colorations de l'éluat sont lues, dans l'heure qui suit, au spectrophotomètre à 575 m μ contre un blanc provenant d'un emplacement du chromatogramme le plus voisin possible de la tache à doser (pour l'asparagine, les lectures au spectrophotomètre se font à 350 m μ). Avec la révélation décrite ci-dessus, la proline et l'hydroxyproline forment un complexe violet après le séjour à l'étuve à 38°. Des courbes de référence sont construites à partir de quantités déterminées (0 à 20 μ g) de chaque acide aminé séparé dans les mêmes conditions expérimentales (électrophorèse, chromatographie, etc.). (BISERTE, BOULANGER ET PAYSANT³.)

D. FRACTIONNEMENT DE BASE PAR ÉLECTROPHORÈSE À pH 3.9

1. Description de la méthode

L'électrophorèse à pH 3.9 s'effectue dans un appareil en V renversé, sur du papier Arches 304 (28 \times 40 cm), pendant 4 h, sous un potentiel de 300 à 400 V. Le dépôt du mélange des aminoacides à séparer se fait à 12 cm du bord anodique de la feuille préalablement imbibée de tampon, le long d'une ligne de 1.5 à 3 cm, perpendiculaire au grand axe de la feuille. Le volume déposé est habituellement de l'ordre de 10 à 20 μ l.

Après la migration électrophorétique, la feuille est séchée à l'air libre, puis ventilée pendant 15 h ou séchée une demi-heure à l'étuve à 100°, et finalement révélée par pulvérisation ou par trempage dans le réactif à la ninhydrine.

2. Possibilités séparatives

Les avantages de cette première étape sont nombreux:

le tampon utilisé (pyridine-acide acétique-eau) est entièrement volatil et ne cause donc aucune gêne pour les étapes chromatographiques ultérieures;

cette électrophorèse ne nécessite qu'un appareillage simple et n'exige pas de potentiel élevé;

son pouvoir séparatif est très satisfaisant.

En effet, les acides aminés d'un hydrolysats total de protéine se séparent très facilement en 4 groupes principaux (GRASSMANN, HANNIG ET PLÖCKL¹⁴): acide aspartique, acide glutamique, le groupe de tous les acides aminés à comportement

neutre et le groupe des acides aminés à comportement basique (histidine + lysine + arginine) (Fig. 3).

Après oxydation de l'hydrolysats par l'acide performique, l'acide cystéique formé se sépare également et se localise en avant de l'acide aspartique (Fig. 4).

Dans le cas d'un milieu biologique, la séparation de base est encore plus poussée dès ce premier stade: les acides ω -aminés se situent entre les acides aminés "neutres"

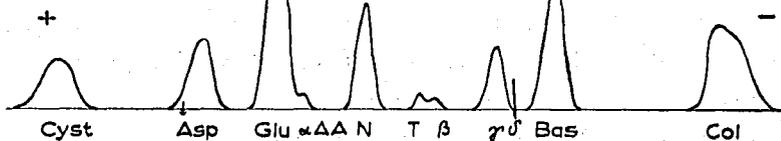
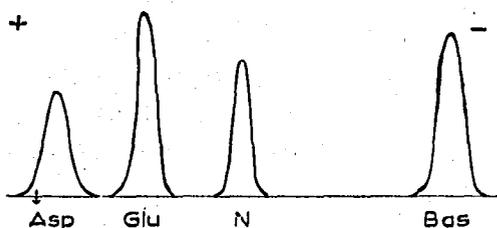


Fig. 3. Electrophorogramme sur papier en tampon acide acétique-pyridine de pH 3.9 (hydrolysats total de protéine). Papier: Arches No. 304; durée: 4 heures sous 320 V; point de départ: 12 cm du côté anodique (la flèche figure le point de dépôt du mélange des acides aminés). Asp: acide aspartique; Glu: acide glutamique; N: acides aminés "neutres"; Bas: acides aminés "basiques" (lysine, arginine, histidine). Les courbes correspondent à l'enregistrement des colorations à la ninhydrine standardisées, à l'aide d'un photodensitromètre équipé d'un filtre vert à 530 m μ . L'enregistrement est réalisé à partir des bandes d'électrophorèse préalablement imbibées par de l'huile de transparence. Le déroulement de la bande se fait mm par mm devant une fente de 1 mm de largeur et de 25 mm de longueur.

Fig. 4. Electrophorogramme sur papier en tampon acide acétique-pyridine de pH 3.9 (acides aminés libres décelables dans un milieu biologique). Conditions expérimentales identiques à celles décrites dans la Fig. 3. La flèche indique le point de départ de l'électrophorèse. Cyst = acide cystéique; Asp = acide aspartique; Glu = acide glutamique; α AA = acide α -aminoadipique; N = acides aminés "neutres"; T = acide β -aminoisobutyrique ou T-spot; β = β -alanine; γ = acide γ -amino-butyrique; δ = acide δ -aminovalérique; Bas = acides aminés basiques (arginine, lysine, méthylhistidine, histidine, ornithine); Col = colamine.

et les acides aminés "basiques"; la colamine se localise au delà du groupe des acides aminés "basiques" (Fig. 4).

Bien souvent, l'aspect de l'électrophorogramme est encore plus complexe. Afin de préciser davantage les possibilités de cette méthode, nous avons étudié le comportement de nombreux dérivés "ninhydrine positive" ou non, naturels ou synthétiques, dans les diverses zones de l'électrophorogramme à pH 3.9.

(a) Zone des composés à comportement acide (Figs. 5 et 6)

(i) Composés "ninhydrine positive". Dans toute la région de l'électrophorogramme située en avant du groupe des acides aminés "neutres", on peut trouver un certain nombre de composés "ninhydrine positive" tels que l'acide homocystéique qui se sépare facilement de l'acide cystéique, le tyrosine-O-sulfate qui se situe juste en avant de l'acide aspartique, le glutathion traité par l'acide performique (G-SH \rightarrow G-SO₃H) qui se situe entre l'acide cystéique et l'acide aspartique, le glutathion réduit (G-SH) et oxydé (G-S-S-G) qui sont placés entre l'acide aspartique et l'acide glutamique. Le glutathion oxydé est légèrement plus rapide que le glutathion réduit (Fig. 6). Toutefois pour séparer ces deux composés, il faut réaliser un couplage électrophorèse à pH 3.9

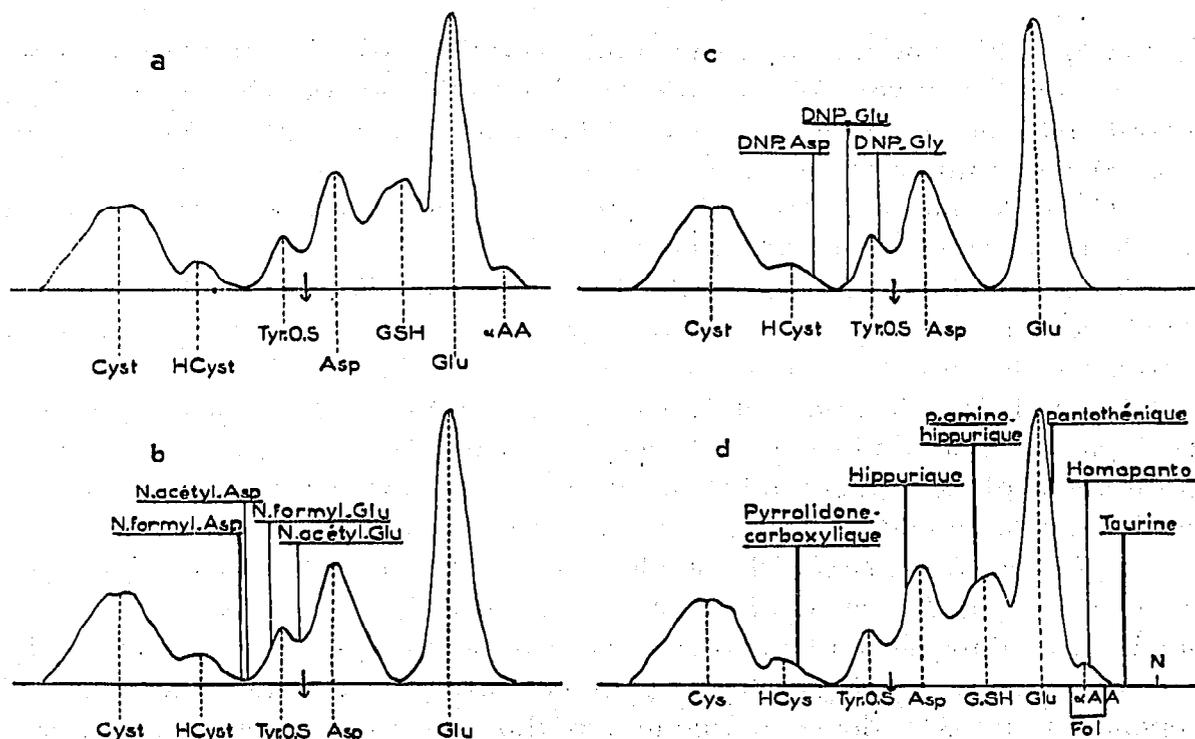


Fig. 5. Electrophorégramme sur papier à pH 3.9 des "composés à comportement acide" (4 h, 320 V, point de départ à 12 cm du côté anodique). (a) Comportement des composés "ninhydrine positive". Cyst = acide cystéique; HCyst = acide homocystéique; Tyr-O-S = tyrosine-O-sulfate; Asp = acide aspartique; GSH = glutathion réduit; Glu = acide glutamique; α AA = acide α -aminoadipique. (b) Comportement des dérivés N-acétylés et N-formylés de l'acide aspartique et de l'acide glutamique (révélation au vert de bromocrésol). (c) Comportement des dérivés dinitro-phénylés de l'acide aspartique, de l'acide glutamique et du glycolle (dérivés colorés en jaune et possédant une fluorescence brune en lumière de Wood). (d) Comportement des formes combinées d'acides aminés ou des dérivés d'acides aminés à comportement acide. Acide pyrrolidone-carboxylique: révélation par la méthode de RYDON ET SMITH⁴⁰; acides hippurique et *p*-aminohippurique: révélation au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde en solution dans l'anhydride acétique; acide panto-thénique et homopantothénique: révélation par la ninhydrine après hydrolyse partielle par pulvérisation d'acide acétique; taurine et N (acides aminés neutres): révélation à la ninhydrine; Fol = acide folique: localisation après élution des bandes et hydrolyse totale suivie d'une identification de l'acide glutamique libéré, par électrophorèse ou chromatographie.

	Glu	Glu	Glu
	G-SH	G-S-S-G	G-SH + G-S-S-G
	Asp	Asp	Asp
→			
	G-SO ₃ H	G-S-SO ₃ H	
	Cys-SO ₃ H	Cys-SO ₃ H	Cys-SO ₃ H
+			

Fig. 6. Comportement en électrophorèse à pH 3.9 du glutathion et de ses dérivés. G-SH = glutathion réduit; G-S-S-G = glutathion oxydé; G-SO₃H = glutathion traité par l'acide performique; G-S-SO₃H = sulfogluthation; Cys-SO₃H = acide cystéique; Glu = acide glutamique; Asp = acide aspartique.

et chromatographie butanol-acide acétique (voir Fig. 10). Le sulfoglutathion (G-S-SO₃H) — synthétisé suivant la méthode de WALEY⁴⁸ — se comporte comme le glutathion traité par l'acide performique (G-SO₃H). L'acide α -aminoadipique se situe juste derrière l'acide glutamique.

(ii) *Dérivés N-substitués des acides aminés dicarboxyliques.* Ces dérivés se localisent également dans la région "acide" (Fig. 5b).

Les dérivés N-acétylés et N-formylés des acides aspartique et glutamique peuvent être facilement repérés par la coloration jaune qu'ils donnent après pulvérisation d'une solution de vert de bromocrésol à 0.9% (p/v) dans l'éthanol à 95° ajustée à pH 4.5. Les dérivés N-formylés et N-acétylés des aminoacides dicarboxyliques, plus "acides" que les acides aminés dont ils dérivent, sont plus rapides qu'eux sur l'électrophorogramme à pH 3.9. L'ensemble des dérivés N-acétylés des autres acides aminés se placent dans la zone de l'acide aspartique et de l'acide glutamique*.

Les dérivés dinitrophénylés des acides aminés dicarboxyliques se séparent assez facilement à pH 3.9. Les autres DNP-aminoacides (tels que le DNP-glycocolle) sont également situés dans cette même région, *mais ils sont un peu moins rapides* (Fig. 5c).

L'électrophorèse à pH 3.9, si elle peut être utile dans certains cas particuliers, doit cependant être considérée comme une méthode accessoire pour la séparation des dérivés N-substitués des acides aminés.

(iii) *Formes combinées d'acides aminés.* Certaines formes combinées d'acides aminés, ainsi que certains dérivés "ninhydrine négative", ont également un comportement "acide". Ce sont principalement (Fig. 5d):

l'acide hippurique et l'acide *p*-aminohippurique, qui peuvent être révélés spécifiquement par une solution de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde à 4% (p/v) dans l'anhydride acétique;

l'acide pantothénique et l'acide homopantothénique, qui sont identifiés après hydrolyse partielle; celle-ci peut être obtenue par 2 pulvérisations successives d'acide acétique à 50%; après chauffage, la β -alanine et l'acide γ -aminobutyrique libérés sont révélables par la ninhydrine (BISERTE, PLAQUET ET BOULANGER⁴);

l'acide folique; l'identification de ce composé est conduite de la façon suivante: après élution de la zone contenant l'acide folique, l'éluat est hydrolysé totalement par l'acide chlorhydrique 5.6 N; dans l'hydrolysat on peut mettre facilement en évidence l'acide glutamique;

le coenzyme A, qui se révèle par le réactif classique au nitroprussiate, caractéristique des groupements SH**.

l'acide pyrrolidone-carboxylique, que l'on peut mettre en évidence à l'aide de la réaction de RYDON ET SMITH⁴⁰ (coloration bleu noir sur fond légèrement bleu).

(iv) *Acides organiques.* On peut également rencontrer dans la région "acide" de l'électrophorogramme des acides organiques (Fig. 7). Les acides fumarique, citrique,

* Le comportement de nombreux N-acétyl-aminoacides a été étudié en chromatographie et électrophorèse sur papier par WHITEHEAD⁴⁰.

** Pour la chromatographie des composés à groupes thiol, notamment le CoA, voir PRICE ET CAMPBELL³⁸.

α -cétoglutarique, malique et succinique s'échelonnent dans la zone des acides aminés à comportement acide; ils sont révélables par le vert de bromocrésol ou mieux par la réaction de SAARNIO⁴¹.

Il résulte de cette étude que les possibilités de séparation dans la zone "acide" de l'électrophorégramme sont relativement satisfaisantes. On peut d'ailleurs éviter que tous les constituants dont nous venons de préciser la position se trouvent simultanément dans la solution à analyser. En effet, le traitement préalable d'un milieu

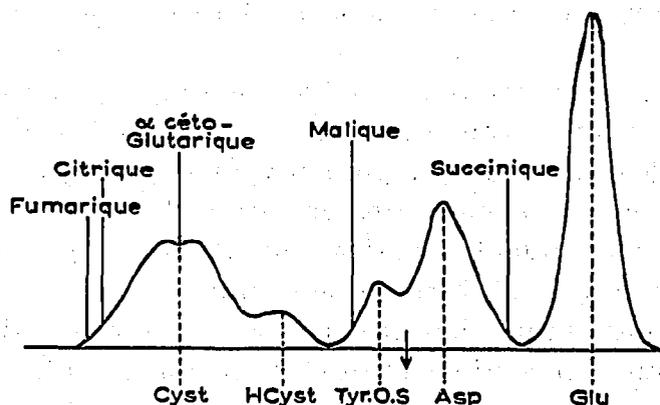


Fig. 7. Electrophorégramme sur papier à pH 3.9 d'acides organiques. Les lignes verticales figurent l'emplacement d'acides organiques par rapport aux acides aminés à comportement acide (révélation des acides organiques par la méthode de SAARNIO⁴¹ à l'aide d'un réactif aniline-xylose).

biologique par une résine échangeuse de cations fortement acide (Amberlite IR 120 ou Dowex 50) permet de simplifier le problème. Les acides aspartique, glutamique, α -aminoadipique et le glutathion sont fixés, tandis que des composés "ninhydrine positive", comme le tyrosine-O-sulfate, ou "ninhydrine négative", comme l'acide folique, les dérivés N-formylés et N-acétylés des acides dicarboxyliques, les acides pantothénique et homopantothénique, les acides hippurique et *p*-aminohippurique, ne sont pas ou sont peu retenus sur les résines à échange de cations.

En conclusion, l'interprétation de cette zone de l'électrophorégramme doit toujours être très prudente dans le cas d'un milieu biologique non hydrolysé, d'autant plus qu'en dehors des composés cités plus haut, des oligopeptides peuvent se localiser également dans cette zone (voir Fig. 10). Il est indispensable de compléter l'étude de cette zone acide par un couplage bidimensionnel "électrophorèse à pH 3.9 et chromatographie butanol-acide acétique". Dans le cas des milieux biologiques hydrolysés totalement, l'interprétation est beaucoup plus facile.

(b) Zone des composés à comportement neutre

Les acides aminés "neutres" (sérine, glycofolle, thréonine, alanine, acide α -aminobutyrique, valine, méthionine, méthionine-sulfone, méthionine-sulfoxyde, leucines, phénylalanine, tyrosine, proline, hydroxyproline, asparagine, glutamine, sarcosine, cystine, tryptophane, acide pipécolique, citrulline) se localisent dans cette zone à comportement neutre à pH 3.9.

Il est important de savoir que la zone des acides aminés "neutres" contient

également le glucose, l'urée et la créatine. Au cours de cette électrophorèse à faible potentiel il n'y a pas de fractionnement de l'ensemble des composés à comportement neutre.

(c) *Zone des acides ω -aminés (Fig. 4)*

L'acide β -aminoisobutyrique ou T-spot, la β -alanine, l'acide γ -aminobutyrique se séparent facilement à pH 3.9 et se localisent dans l'interzone "neutres-basiques". L'acide δ -aminovalérique se trouve également dans cette région, au niveau de l'acide γ -aminobutyrique*.

Les possibilités de séparation des acides ω -aminés sont donc particulièrement intéressantes. Mais il faut savoir que cette interzone "neutres-basiques" est très souvent occupée par des oligopeptides qui peuvent se superposer aux acides ω -aminés et les masquer (voir Fig. 10). Aussi l'interprétation de cette région doit-elle être faite avec une grande prudence dans le cas des milieux biologiques non hydrolysés; il est indispensable de comparer les électrophorégrammes avant et après hydrolyse totale et d'effectuer une étude supplémentaire par un couplage bidimensionnel "électrophorèse à pH 3.9 et butanol-acide acétique" (voir paragraphe E).

(d) *Zone des composés à comportement basique (Fig. 4)*

À pH 3.9, l'arginine, l'ornithine, la lysine, l'histidine et la méthylhistidine ne se séparent pas l'une de l'autre. Seul de tous les acides diaminés, l'acide α, γ -diaminobutyrique se distingue assez nettement, car il migre davantage vers la cathode (Fig. 8). Au contraire, le dipeptide *carosine* (β -alanylhistidine) est un peu moins rapide

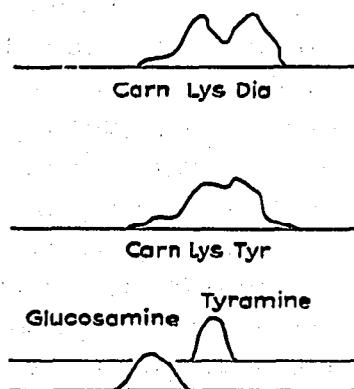


Fig. 8. Electrophorèse à pH 3.9 des composés "ninhydrine positive" à "comportement basique" (4 h, 350 V, point de départ à 9 cm du côté anodique; distance parcourue par la lysine à partir du point de départ: 16.3 cm). Lys = lysine (l'arginine, l'ornithine, l'histidine et la méthylhistidine ont un comportement identique à celui de la lysine); Dia = acide α, γ -diaminobutyrique; Carn = carosine; Tyr = tyramine; Glucosamine: la glucosamine se comporte sensiblement comme la carosine.

* Après élution de cette zone, on peut réaliser une chromatographie bidimensionnelle classique (butanol-acide acétique et phénol (NH_3)). En plaçant des témoins latéraux et un témoin interne de valine, il est facile de distinguer l'acide γ -aminobutyrique et l'acide δ -aminovalérique qui se situent au voisinage de la valine.

Solvant butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5): R_F acide γ -aminobutyrique = 0.43, R_F acide δ -aminovalérique = 0.49.

Solvant phénol (NH_3): R_F acide γ -aminobutyrique = 0.77, R_F acide δ -aminovalérique = 0.79.

que les acides aminés basiques. Dans les extraits de muscle, sa présence se traduit par un relèvement de la pente ascendante du sommet correspondant aux acides aminés basiques. Cet accident disparaît sur les électrophorogrammes des hydrolysats totaux de ces extraits.

La *tyramine* est la seule amine biologique que l'on peut rencontrer dans ce groupe des composés à comportement basique. On y trouve également la *glucosamine* (Fig. 8).

(e) Zone des amines

La plupart des amines biologiques, qui accompagnent les acides aminés dans le fractionnement sur résines à échange de cations, viennent se placer *au delà* des acides aminés basiques, du côté cathodique.

Le composé le plus souvent rencontré est la *colamine*, que l'on peut identifier

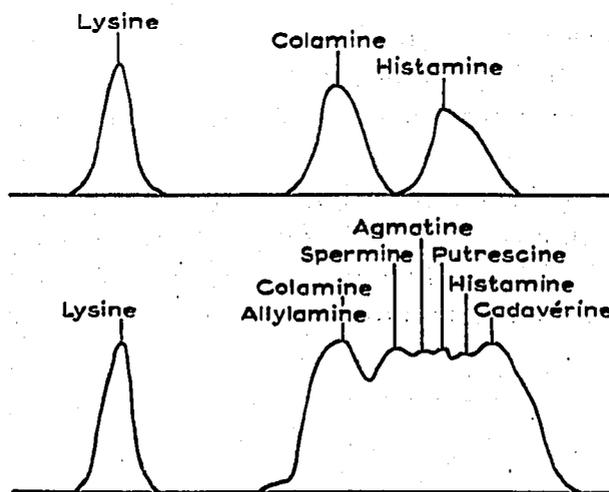


Fig. 9. Electrophorèse à pH 3.9 des amines biologiques (320 V, 210 min, point de départ: 8 cm du côté anodique, révélation à la ninhydrine; distance parcourue par la lysine à partir du point de départ: 16 cm). La majorité des amines viennent se placer au delà de la colamine du côté cathodique. Leur séparation n'est pas possible. La colamine est le composé le plus fréquemment rencontré. La tyramine se comporte comme les acides aminés basiques.

facilement à l'aide d'un témoin latéral. Il faut toutefois signaler que cette zone contient fréquemment d'autres composés colorables à la ninhydrine; la majorité des amines biologiques (cadavérine, putrescine, agmatine, allylamine, histamine) viennent se placer dans cette région et ne peuvent être séparés efficacement par cette méthode (Fig. 9)*.

La β -mercaptoéthylamine (révélation à la ninhydrine et révélation au nitro-

* Le comportement chromatographique de ces amines est lui aussi très particulier. Dans le système phénol(NH_3), elles forment des traînées allongées dont le R_F est voisin de 1. Le butanol-acide acétique permet la séparation de la tyramine et de la colamine. Si l'on donne arbitrairement la valeur de 1 au R_F de la tyramine (amine la plus rapide), le R_F de la colamine est de 0.59. FISCHER ET BOHN¹⁰ effectuent la séparation des amines en électrophorèse sur papier en tampon pyridine-acide acétique-acide citrique. GÄYER¹¹ utilise l'électrophorèse à haut potentiel. Une séparation partielle des amines par électrophorèse sur papier (à pH 4 et à pH 6.5) et par chromatographie sur papier a été décrite également par HERBST¹⁰. KAPPELLER-ADLER ET IGGO¹⁴ ont séparé l'histamine et ses dérivés N-méthylés par chromatographie sur papier et LOCKHART²⁰ a étudié le comportement chromatographique des dérivés dinitrophénylés des amines.

prussiate de sodium) se rencontre également dans cette zone de l'électrophorogramme, ainsi que la *spermine*.

En conclusion, l'électrophorèse à pH 3.9 constitue une étape de fractionnement de base très intéressante. Quant aux composés dont ce premier stade n'a pu réaliser la résolution, c'est-à-dire principalement le groupe des acides aminés "neutres" et celui des acides aminés "basiques", ils doivent être obligatoirement soumis à d'autres techniques séparatives après élution automatique quantitative.

E. IDENTIFICATION PARTICULIÈRE DES COMPOSÉS À COMPORTEMENT ACIDE
ET DES COMPOSÉS À COMPORTEMENT LÉGÈREMENT BASIQUE
(COUPLAGE BIDIMENSIONNEL ÉLECTROPHORÈSE
À pH 3.9 ET CHROMATOGRAPHIE BUTANOL-ACIDE ACÉTIQUE)

Pour obtenir une séparation plus sélective des composés à comportement acide et des composés à comportement légèrement basique, il est recommandé d'effectuer un couplage bidimensionnel électrophorèse à pH 3.9 et chromatographie butanol-acide acétique (Fig. 10).

L'électrophorèse est réalisée dans un appareil en V renversé de grandes dimensions, sous 600 V, pendant 8 h, dans le sens de la plus grande longueur d'une feuille de papier Whatman No. 1, le dépôt de la solution à analyser se faisant en un point situé dans un coin de la feuille de papier à 18 cm du côté anodique et à 10 cm de l'autre bord.

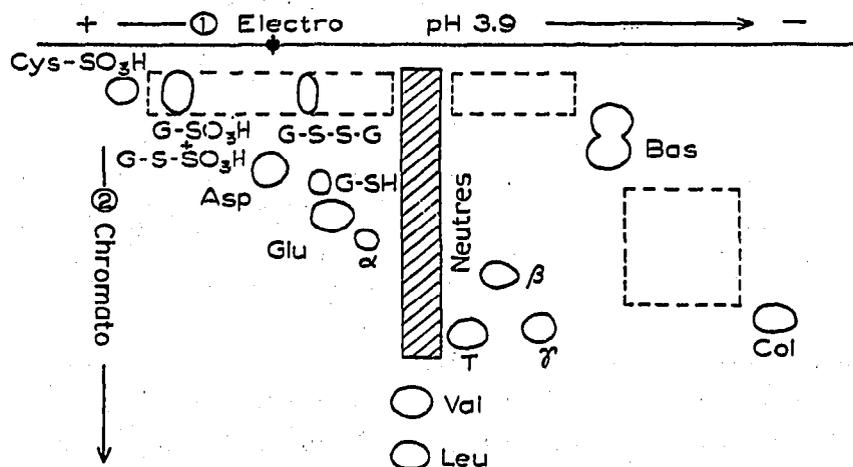


Fig. 10. Séparation des composés acides et des composés légèrement basiques (couplage bidimensionnel comportant une électrophorèse à pH 3.9 sur une feuille de papier Whatman No. 1 (57 × 47 cm) en première dimension et une chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) en seconde dimension). Les abréviations suivantes ont été utilisées: Cys-SO₃H = acide cystéique; Asp = acide aspartique; G-SH = glutathion réduit; G-S-S-G = glutathion oxydé; G-SO₃H = glutathion traité par l'acide performique; G-S-SO₃H = sulfogluthation; Glu = acide glutamique; α = acide α -aminoadipique; Val = valine; Leu = leucines; Neutres = ensemble des acides aminés neutres; T = acide β -aminoisobutyrique ou T-spot; β = β -alanine; γ = acide γ -aminobutyrique; Bas = acides aminés à comportement basique (ornithine, lysine, arginine, histidine, méthylhistidine) + glucosamine + carnosine + ansérine; Col = colamine. Dans la zone des acides aminés neutres, des ébauches de séparation peuvent être observées, de même que dans la zone des composés basiques. Les rectangles limités par des lignes pointillées correspondent aux zones où l'on rencontre le plus souvent, au cours de l'étude des milieux biologiques complexes, de nombreux composés "ninhydrine positive" qui ne correspondent pas à des acides aminés.

Après séchage sous une hotte par ventilation d'air froid pendant 16 h, la chromatographie descendante dans le système classique *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) est effectuée pendant 24 à 36 h.

Après révélation, on obtient dans la zone des composés acides une séparation très satisfaisante de l'acide cystéique, de l'acide aspartique, des différentes formes du glutathion, de l'acide glutamique, de l'acide α -aminoadipique. Dans les milieux biologiques non hydrolysés, on observe également de nombreux oligopeptides dans cette région du papier (Fig. 10). Dans l'interzone "composés neutres-composés basiques", l'identification de l'acide β -aminoisobutyrique, de la β -alanine et de l'acide γ -aminobutyrique est très aisée. La séparation des acides aminés basiques et celle des composés à comportement neutre sont insuffisantes. Ce couplage est particulièrement intéressant pour étudier les milieux biologiques non hydrolysés (voir BISERTE, BOULANGER ET PAYSANT³). La présence en différentes régions du chromatogramme d'oligopeptides ou d'autres composés réagissant à la ninhydrine et distincts des acides aminés habituels, peut être confirmée par la comparaison des couplages bidimensionnels des fractions hydrolysées et non hydrolysées.

F. IDENTIFICATION PARTICULIÈRE DES COMPOSÉS À COMPORTEMENT NEUTRE
(COUPLAGE BIDIMENSIONNEL ÉLECTROPHORÈSE
À pH 2.4 ET CHROMATOGRAPHIE BUTANOL-ACIDE ACÉTIQUE-EAU)

L'électrophorèse à pH 2.4 (solution d'acide acétique 1 *N*), si elle est par elle-même insuffisante pour la résolution des acides aminés "neutres", peut être utilisée de façon très satisfaisante comme première dimension d'un couplage électrophorèse-chromatographie.

Elle est réalisée dans un appareil en V renversé de grandes dimensions, sous 400 V, pendant 18 h, dans le sens de la plus grande dimension d'une feuille de papier Whatman No. 3 (46 × 57 cm), le point de départ se trouvant à 8 cm du bord anodique et à 10 cm de l'autre bord. Le dépôt des acides aminés se fait par élution automatique à partir de la bandelette découpée sur un électrophorégramme à pH 3.9. L'appareil d'élution est équipé avec un moteur de 1 tour/12 h et une seringue de 20 ml; l'opération est prolongée pendant 45 min.

Après séchage de la feuille, cette électrophorèse est suivie d'une chromatographie unidimensionnelle descendante dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5), effectuée dans le sens perpendiculaire à la migration électrophorétique, et dont la durée est de 20 h. Le chromatogramme est séché soit à l'étuve à 100°, soit, si l'on désire effectuer une chromatographie quantitative, à la température ordinaire pendant 2 jours par ventilation d'air froid dans une atmosphère exempte d'ammoniac. La révélation est réalisée de préférence par la solution de ninhydrine à 1% (voir paragraphe C).

Dans ces conditions, la résolution des acides aminés "neutres" est très satisfaisante (Fig. 11). C'est ainsi que la sérine et le glycofolle, la méthionine et la valine, la phénylalanine et les leucines sont nettement séparées, ainsi que le tryptophane.

La méthionine-sulfone se place au voisinage de l'hydroxyproline; mais l'identification de celle-ci ne pose pas de problème particulier du fait de la coloration orange qu'elle donne à la révélation à la ninhydrine*; elle peut d'ailleurs être révélée également à l'aide de réactions spécifiques, notamment celle de JEPSON ET SMITH²². La distinction entre l'asparagine et la glutamine est également facilitée par des différences de coloration (glutamine: violette; asparagine: brune). La citrulline se place au même endroit que la glutamine. Après hydrolyse totale du milieu biologique, la persistance

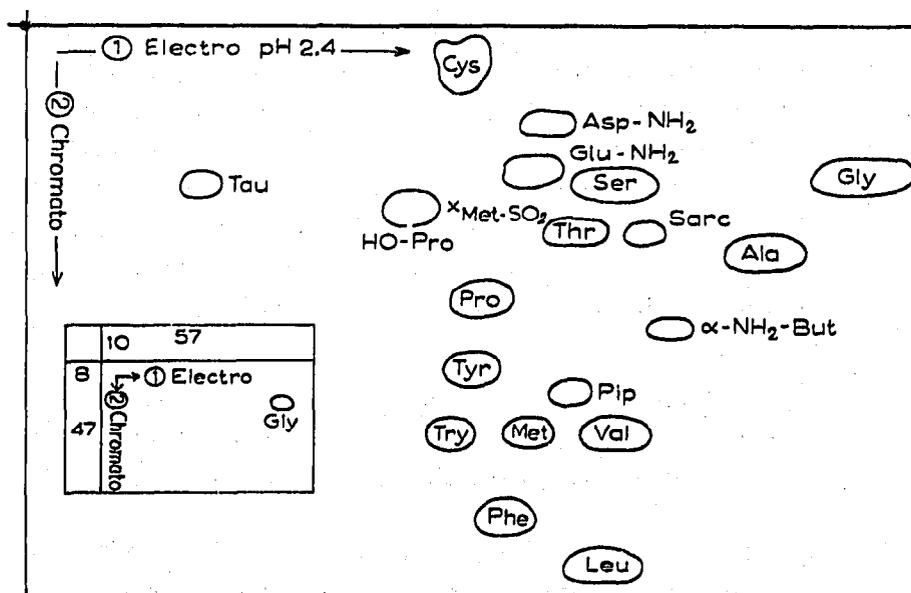


Fig. 11. Séparation des acides aminés "neutres" (électrophorèse à pH 2.4 suivie d'une chromatographie unidimensionnelle dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5). 1^{ère} opération: Electrophorèse dans le sens de la plus grande dimension (57 cm) d'une feuille de papier Whatman No. 3 dans un appareil type DURRUM (400V, 18h). Le point de dépôt (point noir sur le schéma) se trouve à 8 cm du bord de la feuille du côté anodique et à 10 cm de l'autre bord. Après 18 h de passage du courant, le glyocolle se trouve à 43 cm du point d'origine. 2^{ème} opération: Chromatographie unidimensionnelle dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5) pendant 20 h (ou davantage). À la partie inférieure gauche de la figure, nous avons représenté la position du point d'origine et la disposition générale de l'opération. Gly indique la position du glyocolle à la fin du couplage. Les abréviations suivantes ont été utilisées; Tau = taurine; Cys = cystine; Asp-NH₂ = asparagine; Glu-NH₂ = glutamine; Ser = sérine; Gly = glyocolle; HO-Pro = hydroxyproline; Met-SO₂ = méthionine-sulfone; Thr = thréonine; Sarc = sarcosine; Pro = proline; α -NH₂-But = acide α -aminobutyrique; Tyr = tyrosine; Pip = acide pipécolique; Try = tryptophane; Met = méthionine; Val = valine; Phe = phénylalanine; Leu = leucines. Les positions de la sarcosine, de la proline, de l'hydroxyproline, de l'acide pipécolique, de la citrulline (qui occupe la même position que la glutamine) et du tryptophane peuvent être confirmées par des réactions spécifiques. L'asparagine (coloration brune) et la glutamine disparaissent à l'hydrolyse totale. La présence de méthionine-sulfone doit être confirmée à l'aide d'un témoin interne. Dans les milieux biologiques, de nombreux autres composés "ninhydrine positive" peuvent se rencontrer sur la carte.

* Cette coloration orange est observée au début de la révélation avec le réactif à la ninhydrine concentré; après le séjour à l'étuve à 38°, l'hydroxyproline présente la coloration violet-pourpre classique (pour le mécanisme de formation du complexe pourpre, voir JOHNSON ET McCALDIN²³).

La séparation des acides aminés cycliques (hydroxyproline, allohydroxyproline, proline, baïkiane, acide pipécolique, acide 5-hydroxypipécolique, acide allo-5-hydroxypipécolique) peut être réalisée par une chromatographie bidimensionnelle suivant la méthode de PRÉZ, IRREVERRE ET WOLFF²⁷ (première dimension: alcool butylique tertiaire-acide formique à 88% - eau (70:15:15) (v/v), 18 h sur papier Schleicher et Schüll No. 598; seconde dimension: alcool amylique tertiaire-2,4-lutidine-eau (178:178:114) (v/v), 18 à 22 h).

d'une tache ninhydrine positive dans cette zone rend nécessaire la réalisation d'une révélation spécifique de la citrulline. Le seul problème qui ne soit pas résolu est celui de la séparation leucine-isoleucine; mais celle-ci peut être facilement obtenue par l'utilisation du système-solvant de HÖGSTRÖM²⁰ (méthyléthylcétone-acétone-eau (3:1:0.6)): on peut le mettre en œuvre soit en chromatographie unidimensionnelle descendante pendant 30 h, après avoir préalablement séparé les acides aminés "neutres" en électrophorèse à pH 3.9 et élué automatiquement la zone correspondante sur une bande de papier Whatman No. 1; soit en un couplage bidimensionnel "électrophorèse à pH 2.4 et chromatographie", en partant de cette même zone des acides aminés neutres*. Les R_F calculés par rapport à celui du tryptophane sont les suivants: isoleucine: R_F (Try) 0.78; leucine: R_F (Try) 0.86.

Dans les milieux biologiques complexes, de nombreuses taches "ninhydrine positive" qui ne correspondent pas à des acides aminés neutres peuvent être décelées sur le papier. L'interprétation de la zone délimitée par la cystine, l'hydroxyproline et la glutamine est souvent délicate.

G. IDENTIFICATION PARTICULIÈRE DES COMPOSÉS À COMPORTEMENT BASIQUE

1. Chromatographie bidimensionnelle

Après élution, à partir d'un électrophorégramme à pH 3.9, de la bande des acides aminés basiques, l'étude de ces composés peut être abordée par la chromatographie bidimensionnelle classique (butanol-acide acétique et phénol (NH_3)).

L'identification de la glucosamine, de la tyramine, éventuellement de l'acide γ -aminobutyrique, est facile. La zone des acides aminés basiques est déjà nettement moins confuse que sur le chromatogramme bidimensionnel obtenu à partir du mélange initial qui n'a pas été "simplifié" par électrophorèse à pH 3.9. Toutefois, on ne peut obtenir de cette façon des résultats précis**.

2. Électrophorèse dans l'ammoniaque 1 N (pH 11.7)

La séparation de l'histidine, de la lysine et de l'arginine est facilement réalisée par une électrophorèse à pH 11.7 (solution d'ammoniaque 1 N) dans un appareil en V renversé, sur du papier Whatman No. 1, sous un potentiel de 400 V, pendant 15 h, la ligne de départ étant placée à 11 cm du bord cathodique de la feuille***. Le dépôt des acides aminés se fait par élution automatique à partir de la bandelette qui contient les composés basiques et qui a été découpée sur un électrophorégramme à pH 3.9. Il est indispensable de placer des témoins latéraux.

* Cette chromatographie doit être effectuée dans des cuves en verre, car les cuves en chlorure de polyvinyle se déforment en présence de ce système-solvant.

** La séparation des acides aminés basiques sur un papier imprégné par une résine à échange de cations (28 % d'Amberlite IR 120) est relativement satisfaisante (TUCKERMANN⁴⁵).

*** Le tampon de pH 11.6 (phosphate disodique-soude) utilisé par GERLAXHE, CASIMIR ET RENARD¹² a été utilisé également pour la séparation des acides aminés basiques. Il a le désavantage de ne pas être volatil. HARRIS ET WARREN¹⁷ ont également réalisé l'électrophorèse de ces composés à pH 11.5 (tampon CO_3Na_2 0.05 M).

Les possibilités séparatives de ce procédé sont nettement meilleures que celles des méthodes chromatographiques. Il permet en effet d'identifier aisément, en présence de témoins latéraux, l'arginine, la lysine et l'ornithine (Fig. 12).

Toutefois, dans le cas des milieux biologiques, le problème est beaucoup plus complexe: la zone des acides aminés "basiques" à pH 3.9 peut contenir, outre l'arginine, la lysine et l'ornithine, de l'histidine, de la méthylhistidine, de la glucosamine,

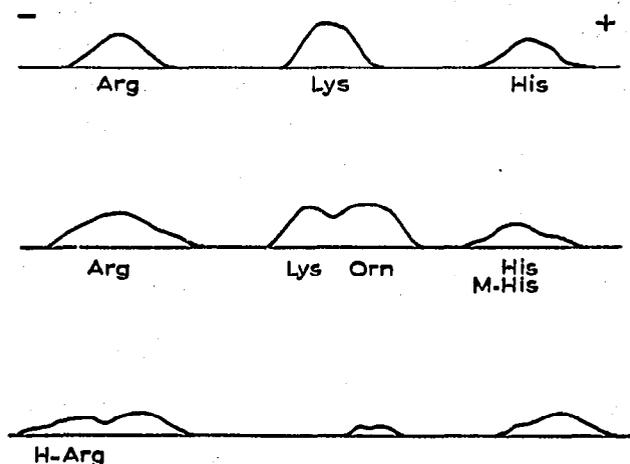


Fig. 12. Electrophorèse à pH 11.7 (NH_4OH 1 N) des acides aminés basiques (papier Whatman No. 1, départ à 11 cm de la cathode, 400 V pendant 15 h, dans un appareil type DURRUM). Arg = arginine (distance parcourue à partir du point de départ: 4 cm); Lys = lysine (distance parcourue à partir du point de départ: 9.5 cm); Orn = ornithine (distance parcourue à partir du point de départ: 11.5); His = histidine; M-His = méthylhistidine (distance parcourue à partir du point de départ: 16 cm); la carnosine ne se sépare pas du groupe histidine-méthylhistidine; H-Arg = homoarginine (distance parcourue à partir du point de départ: 3 cm). *En haut*: Séparation du mélange arginine-lysine-histidine (cas d'un hydrolysat total). *Au milieu*: Séparation du mélange arginine-lysine-ornithine-histidine et méthylhistidine (cas fréquent d'un mélange d'acides aminés basiques d'un milieu biologique). *En bas*: séparation du mélange homoarginine-arginine-lysine-histidine (cas d'une protéine partiellement guanidylée où la lysine est transformée en homoarginine).

de la tyramine*, des peptides à caractère basique tels que la carnosine et l'ansérine; elle peut comporter éventuellement de l'acide γ -aminobutyrique provenant d'une récupération trop large de la bande des acides aminés basiques.

La présence éventuelle de la glucosamine et de la tyramine peut être déterminée par une chromatographie bidimensionnelle classique (voir plus haut paragraphe G 1). Mais de toute façon l'électrophorèse à pH 11.7 ne permet pas de séparer l'histidine de la méthylhistidine.

3. *Électrophorèse à pH 6.5*

Le problème de la séparation de l'histidine et de la méthylhistidine peut être résolu par une électrophorèse pratiquée en tampon volatil de pH 6.5 (pyridine-acide acétique-eau (200:8:1792)) dans un appareil en V renversé de grandes dimensions, sur du papier Whatman No. 1, pendant 15 h, sous un potentiel de 400 V, le dépôt étant effectué à 28.5 cm du bord cathodique de la feuille et le papier étant placé de

* La glucosamine peut empiéter sur l'arginine, et la tyramine sur la lysine.

façon dissymétrique avec un côté cathodique plus long (30.5 cm) que le côté anodique.

Dans ces conditions, la séparation de l'histidine et de la méthylhistidine est satisfaisante (Fig. 13). Dans les hydrolysats totaux, elle peut donc s'appliquer utilement à l'identification et au dosage de ces acides aminés.

Dans certains milieux biologiques non hydrolysés (muscle, urine par exemple), la séparation est cependant plus délicate du fait de la présence de la carnosine (β -

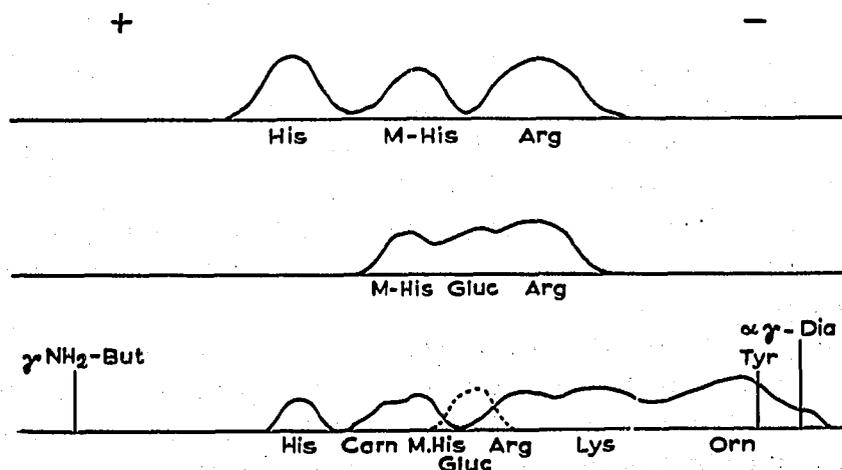


Fig. 13. Electrophorèse des acides aminés basiques en tampon pyridine-acide acétique de pH 6.5 (pyridine: 200 ml; acide acétique: 8 ml; eau: q.s.p. 2000 ml). Appareil d'électrophorèse en V renversé; le papier est placé de façon dissymétrique avec un côté cathodique plus long (30.5 cm) que le côté anodique (26.5 cm). Point de départ du côté cathodique à 28.5 cm du bord de la feuille. Durée de l'électrophorèse: 15 h sous 400 V. γ -NH₂-But = acide γ -aminobutyrique; His = histidine; M-His = méthylhistidine; Carn = carnosine; Arg = arginine; Gluc = glucosamine; Lys = lysine; Orn = ornithine; Tyr = tyramine; α,γ -Dia = acide α,γ -diaminobutyrique.

alanyl-histidine) et de l'ansérine (β -alanyl-méthylhistidine) qui sont plus ou moins confondues avec la méthylhistidine.

La présence de ces oligopeptides peut être démontrée, après élution et hydrolyse totale de l'éluat, par la mise en évidence de la β -alanine.

4. Électrophorèse à pH 8.9

L'électrophorèse en tampon véronal de pH 8.9 ($\mu = 0.1$) permet d'effectuer la séparation de la méthylhistidine et de la carnosine et peut être utilisée pour leur identification à l'aide de témoins latéraux. Cette électrophorèse est très intéressante dans certains cas particuliers, comme celui des extraits musculaires où la carnosine est abondante. Signalons que SCHMIDT ET CUBILES⁴² utilisent également l'électrophorèse à pH 9 (solution acétate d'ammonium 0.03 M ajustée à pH 9 par de l'ammoniaque 0.1 N) pour séparer l'ensemble ansérine + carnosine des autres acides aminés; mais les deux dipeptides restent eux-mêmes confondus.

5. Couplages divers

Dans certains cas particuliers, l'électrophorèse bidimensionnelle (électrophorèse avec une solution d'ammoniaque 1 N dans les deux sens; électrophorèse en première

dimension dans l'ammoniaque 1 *N* et dans un tampon borax 0.05 *M*-soude 0.05 *N* de pH 10 en seconde dimension), les couplages "électrophorèse à pH 11.7 ou à pH 6.5 en première dimension et chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau en seconde", peuvent quelquefois permettre une séparation intéressante de composés à comportement basique.

H. DISCUSSION DE LA MÉTHODE

Nous ne pouvons comparer la méthode décrite à celle de GRASSMANN, HANNIG ET PLÖCKL¹⁴, qui consiste d'une part en une électrophorèse continue à pH 3.9 et d'autre part en une chromatographie unidimensionnelle des acides aminés neutres et basiques, soit dans un solvant phénolique, soit dans le solvant butanol-acide acétique-eau. Si le procédé de GRASSMANN présente un pouvoir résolutif satisfaisant pour l'étude d'un hydrolysats total de protéine, sa spécificité est cependant trop limitée pour les milieux biologiques complexes.

Il est également difficile de comparer notre mode opératoire aux méthodes d'électrophorèse à haut potentiel, dont le pouvoir de résolution est très grand, mais dont les difficultés techniques sont importantes; rappelons qu'aucune des étapes successives que nous préconisons n'exige d'électrophorèse sous un potentiel élevé.

La discussion portera donc surtout sur les méthodes d'électrophorèse bidimensionnelle et les autres couplages électrophorèse-chromatographie actuellement décrits.

Les méthodes d'électrophorèse bidimensionnelle les plus connues sont celle de DURRUM⁹ (électrophorèse en tampon borate 0.02 *M* de pH 9 sur une bandelette étroite et électrophorèse en milieu acide acétique 0.25 *N* de pH 2.7), celle de MEAD³¹ (électrophorèse en tampon phtalate 0.02 *M* de pH 2.5 et électrophorèse en solution ammoniacale de pH 11.6) et celle de WHITEHEAD⁴⁰ (électrophorèse en milieu acide acétique 1 *N* en première dimension et en borate de sodium 0.025 *M* de pH 9.2 en seconde dimension). Elles ne présentent aucun avantage sur le mode opératoire que nous proposons et elles ne sont pas sans inconvénients. Dans la méthode de DURRUM, les acides aminés basiques sont perdus; dans celle de MEAD, si la résolution des acides aminés basiques est très satisfaisante, celle des acides à longue chaîne et des composés à caractère acide l'est beaucoup moins; dans celle de WHITEHEAD, la valine et la leucine ne sont pas séparées.

Un certain nombre de couplages électrophorèse-chromatographie ont été publiés, notamment par DURRUM⁹, VERHELLE ET MERLEVEDE⁴⁶, HONEGGER²¹, KICKHÖFEN ET WESTPHAL²⁵, BLASS, LECOMTE ET POLONOVSKI⁵, GERLAXHE ET RENARD¹³, MONNIER HUGUET ET GRAS³⁴, LI et coll.²⁸, KNAUFF²⁶, WAGNER⁴⁷. Le principe est toujours sensiblement le même: électrophorèse le plus souvent en milieu acide et chromatographie unidimensionnelle en général dans un solvant butanolique acide.

Citons par exemple les couplages de GERLAXHE ET RENARD¹³: électrophorèse à pH 2.4 et chromatographie dans le solvant butanol-acide formique à 95%-eau (77:15:8); électrophorèse à pH 11.6 et chromatographie dans le solvant butanol-acide formique-eau; chromatographie en phénol tamponné à pH 5.6 et électrophorèse en

tampon phosphate de pH 5.6 de force ionique 0.025; celui de KICKHÖFEN ET WESTPHAL²⁵: électrophorèse à haut potentiel (70 V/cm) à pH 1.9 en milieu acide acétique 2 *N* et chromatographie dans le mélange pyridine-acide acétique-eau (50:35:15); celui de HONEGGER²¹: électrophorèse en tampon citrate 0.1 *M* de pH 3.8 et chromatographie ascendante dans le solvant *n*-butanol-éthanol-eau-acide acétique (8:4:3:1); celui de KNAUFF²⁰: électrophorèse à haut potentiel (80-100 V/cm) dans un tampon acide fumarique-acide acétique de pH 1.9 et chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5); celui de LOCKHART ET ABRAHAM³⁰ et de LI et coll.²⁸: électrophorèse à pH 7 dans un tampon collidine-acide acétique-eau et chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau ou butanol-acide acétique-pyridine-eau (30:6:20:24).

Dans le cas d'un hydrolysats total, les séparations obtenues par ces procédés sont satisfaisantes et nettement supérieures à celles de la chromatographie bidimensionnelle. Au cours de la mise au point de notre méthode, nous avons été amenés à choisir dans la liste qui précède les tampons et les systèmes solvants les plus efficaces. D'autre part, dans des couplages de cet ordre, il ne semble pas indispensable d'employer l'électrophorèse à haut potentiel: c'est ainsi que les résultats que nous obtenons pour la séparation des composés neutres avec l'électrophorèse à pH 2.4 à potentiel relativement bas sont comparables à ceux de l'électrophorèse à haut potentiel (70 V/cm) à pH 1.9 suivant KICKHÖFEN ET WESTPHAL²⁵.

Pour les milieux biologiques complexes, les couplages précédents ne permettent qu'une résolution partielle des problèmes posés; le chevauchement des composés neutres et acides, la perte fréquente des composés basiques, constituent souvent des inconvénients majeurs dans les méthodes qui ne comportent qu'une seule étape. C'est pour obtenir le maximum de sélectivité que nous avons proposé un mode opératoire en plusieurs étapes, en retenant notamment un fractionnement de base simple de l'ensemble et en étudiant ensuite plus spécialement la séparation des composés neutres, acides et basiques. Notre combinaison de méthodes présente alors une souplesse plus grande et peut s'adapter à la plupart des cas. Bien que longue, elle n'est jamais fastidieuse et son application aux urines, aux tissus animaux, nous a donné toute satisfaction.

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent un couplage de méthodes électrophorétiques et chromatographiques classiques applicable à l'étude des acides aminés et de leurs formes combinées dans les milieux biologiques complexes, ainsi qu'à la séparation des oligopeptides. Les étapes essentielles sont les suivantes: fractionnement de base par électrophorèse en tampon volatil de pH 3.9; couplage bidimensionnel comportant une électrophorèse à pH 3.9 et une chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau (composés acides et composés faiblement basiques); couplage bidimensionnel comportant une électrophorèse à pH 2.4 et une chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau après élution automatique des composés neutres préalablement séparés par le fractionnement de base à pH 3.9; électrophorèse à pH

11.7 et à pH 6.5 après élution automatique des composés basiques préalablement séparés par le fractionnement de base à pH 3.9.

Le procédé reste commode et d'une exécution relativement facile; il ne nécessite qu'un appareillage simple et peu coûteux.

SUMMARY

The authors describe a combination of electrophoretic and classical chromatographic methods, which can be used for investigating free amino-acids or amino-acid compounds in complex biological material, as well as for separating oligopeptides. The essential steps in this procedure are the following: preliminary fractionation by electrophoresis in a volatile buffer of pH 3.9; a two-dimensional combination of electrophoresis at pH 3.9 and chromatography in the solvent butanol-acetic acid-water (acid and weakly basic compounds); a two-dimensional combination of electrophoresis at pH 2.4 and chromatography in the solvent butanol-acetic acid-water, after automatic elution of the neutral compounds separated by the preliminary fractionation at pH 3.9; electrophoresis at pH 11.7 and at pH 6.5 after automatic elution of the basic compounds separated by the preliminary fractionation at pH 3.9.

The method is convenient and comparatively easy to carry out; only simple and inexpensive apparatus is required.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. H. BELL *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 5051, 5059, 5067.
- ² G. BISERTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 39 (1957) 661.
- ³ G. BISERTE, P. BOULANGER ET P. PAYSANT, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 2067; *Semaine hôp.*, (sous presse).
- ⁴ G. BISERTE, R. PLAQUET ET P. BOULANGER, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 831.
- ⁵ J. BLASS, O. LECOMTE ET J. POLONOVSKI, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 627.
- ⁶ P. BOULANGER, G. BISERTE ET F. COURTOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 366.
- ⁷ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- ⁸ C. E. DENT, *Biochem. J.*, 43 (1948) 168.
- ⁹ E. L. DURRUM, *J. Colloid Sci.*, 6 (1951) 274.
- ¹⁰ F. G. FISCHER ET H. BOHN, *Z. physiol. Chem.*, 308 (1957) 109.
- ¹¹ J. GÄYER, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 39.
- ¹² S. GERLAXHE, J. CASIMIR ET M. RENARD, *Bull. soc. chim. Belges*, 66 (1957) 251.
- ¹³ S. GERLAXHE ET M. RENARD, *Compt. rend. 27e congr. intern. chim. ind. Bruxelles, 1954, Vol. III; Ind. chim. belge*, 20, No. spécial (1955) 509.
- ¹⁴ W. GRASSMANN, K. HANNIG ET M. PLÖCKL, *Z. physiol. Chem.*, 299 (1955) 258.
- ¹⁵ T. L. HARDY, D. O. HOLLAND ET J. M. C. NAYLER, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 971.
- ¹⁶ J. I. HARRIS, F. SANGER ET M. A. NAUGHTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 427.
- ¹⁷ H. HARRIS ET F. L. WARREN, *Biochem. J.*, 57 (1954) xxxii.
- ¹⁸ W. HAUSMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 3181.
- ¹⁹ E. J. HERBST, *Arch. Biochem. Biophys.*, 75 (1958) 178.
- ²⁰ G. HÖGSTRÖM, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 743.
- ²¹ C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 847.
- ²² J. B. JEPSON ET I. SMITH, *Nature*, 172 (1953) 1100.
- ²³ A. W. JOHNSON ET D. J. MCCALDIN, *J. Chem. Soc.*, (1958) 821.
- ²⁴ R. KAPELLER-ADLER ET B. IGGO, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 394.
- ²⁵ B. KICKHÖFEN ET O. WESTPHAL, *Z. f. Naturforsch.*, 7b (1952) 659.
- ²⁶ H. G. KNAUFF, *Nature*, 182 (1958) 937.
- ²⁷ A. L. LEVY ET D. CHUNG, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 396.

- ²⁸ C. H. LI, I. I. GESCHWIND, R. D. COLE, I. D. RAACKE, J. I. HARRIS ET J. S. DIXON, *Nature*, 176 (1955) 687.
- ²⁹ I. M. LOCKHART, *Nature*, 177 (1956) 393.
- ³⁰ I. M. LOCKHART ET E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.*, 58 (1954) 633.
- ³¹ T. H. MEAD, *Biochem. J.*, 59 (1955) 534.
- ³² H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 489.
- ³³ B. MONDOVI, G. MODIANO ET C. DE MARCO, *Giorn. biochim.*, 4 (1955) 324.
- ³⁴ P. MONNIER, R. HUGUET ET J. GRAS, *IXe Congr. soc. pharm. de France, 7-9 Juin 1957*, G. DE BUSSAC, édit., Clermont-Ferrand, p. 51.
- ³⁵ T. E. PARRY, *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 115.
- ³⁶ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 241.
- ³⁷ K. A. PIEZ, F. IRREVERRE ET A. L. WOLFF, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 687.
- ³⁸ C. A. PRICE ET C. W. CAMPBELL, *Biochem. J.*, 65 (1957) 512.
- ³⁹ R. R. REDFIELD, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 344.
- ⁴⁰ H. N. RYDON ET P. W. G. SMITH, *Nature*, 169 (1952) 922.
- ⁴¹ J. SAARNIO, E. NISKAJAARI ET C. GUSTAFSSON, *Suomen Kemistilehti*, B 25 (1952) 25.
- ⁴² G. SCHMIDT ET R. CUBILES, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 217.
- ⁴³ E. SCHRAM, S. MOORE, W. H. STEIN ET E. J. BIGWOOD, *Biochem. J.*, 57 (1954) 33.
- ⁴⁴ S. P. SEN ET D. P. BURMA, *Trans. Bose Research Inst. Calcutta*, 19 (1953-1955) 19.
- ⁴⁵ M. M. TUCKERMANN, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 231.
- ⁴⁶ O. VERHELLE ET M. MERLEVEDE, *2e Colloq. sur les Protéines, Hôpital St.-Jean, Bruges, 1954*, Arscia, éditeurs, Bruxelles, 1954.
- ⁴⁷ J. WAGNER, *Naturwissenschaften*, 45 (1958) 110.
- ⁴⁸ S. G. WALEY, *Biochem. J.*, 71 (1959) 132.
- ⁴⁹ J. K. WHITEHEAD, *Biochem. J.*, 68 (1958) 653.

J. Chromatog., 3 (1960) 25-47