

CHROM. 5097

## SÉPARATION DES OLIGOPEPTIDES ET DES ACIDES AMINÉS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR RÉSINE ÉCHANGEUSE D'IONS, CHELEX X-100

JACQUES BOISSEAU ET PIERRE JOUAN

*Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire, Équipe associée au C.N.R.S. No. 119, Faculté des Sciences, Rennes (France)*

(Reçu le 25 septembre 1970)

---

### SUMMARY

*Separation of oligopeptides and amino acids by chromatography on the ion-exchange resin, Chelex X-100.*

An improved method is described for the separation of peptides and  $\alpha$ -amino acids using the Chelex X-100 exchanger in the  $\text{Cu}^{2+}$  form. After equilibration of the resin with ammonia solution, pH 10.3, acidic, and neutral peptides, and acidic amino acids are eluted with water. The neutral amino acids and basic peptides are eluted with 1.5 M ammonium hydroxide. Tryptophan, histidine and arginine emerge with 6 M ammonium hydroxide. All fractions are obtained free of  $\text{Cu}^{2+}$ .

---

### INTRODUCTION

La séparation des peptides de faible poids moléculaire des acides aminés reste un problème difficile à résoudre. L'isolement d'un peptide à partir d'un milieu biologique complexe, en vue de la détermination de sa structure primaire, par exemple, nécessite la suppression de toute contamination par des acides aminés libres. Cette purification est rendue malaisée car les oligopeptides et les acides aminés présentent des caractères voisins de solubilité, de poids moléculaire et de charge électrique.

La propriété qu'ont les acides aminés et les peptides de former des chélates avec des ions métalliques a permis l'élaboration de diverses techniques. FAZAKERLEY ET BEST<sup>1</sup> ont obtenu, les premiers, une telle séparation à partir d'une colonne de gel de Séphadex G-25 chargé d'ions cuivriques et équilibré à pH 11 par un tampon salin. Les peptides ne sont pas retenus sur cette colonne à l'inverse des acides aminés qui sont élués par une solution d'acide chlorhydrique 0.1 N. Après cette chromatographie, les corps sont obtenus sous forme de complexes cuivriques ce qui nécessite l'élimination du cuivre pour leur étude ultérieure. Cette méthode est très limitée par la faible capacité de fixation du gel et par l'utilisation du tampon salin. TOMMEL *et al.*<sup>2,3</sup> séparent les peptides et les acides aminés sur des colonnes de DEAE et de TEAE-cellulose à

l'aide de tampons volatiles. Les composés sont complexés au préalable par le cuivre. Les acides aminés, non retenus sur ces colonnes, sont entraînés par une solution tampon d'acétate de collidine à pH 8 et les peptides sont élués par des solutions d'acidité croissante. Les produits doivent finalement être débarrassés du cuivre complexant. Au laboratoire, une technique a été mise au point qui permet une bonne séparation des dipeptides neutres des acides aminés, grâce à une colonne de DEAE-Séphadex équilibrée à pH 8.5 par une solution tampon d'acétate de collidine. L'éluion est réalisée par des solutions d'acidité croissante.

BUIST ET O'BRIEN<sup>4</sup> ont repris la technique de FAZAKERLEY ET BEST en remplaçant le Séphadex par une résine Chelex X-100. Cette résine est un copolymère styrène-divinylbenzène muni de groupements fonctionnels iminodiacétates. Elle présente vis à vis des ions métalliques de transition divalents une affinité supérieure à celle des échangeurs monofonctionnels. Fixé sur la résine, l'ion métallique garde la possibilité de contracter des liaisons de coordination avec des composés qui seront déplacés ultérieurement par un autre coordinant. Cette résine Chelex X-100, saturée par du cuivre, a déjà été utilisée par plusieurs auteurs, pour la fixation sélective des acides aminés à partir de l'eau de mer<sup>5</sup> et pour le fractionnement de composés nucléiques<sup>6</sup>. La technique de séparation des oligopeptides et des acides aminés par une telle résine est basée sur les propriétés complexantes du cuivre vis à vis de ces deux groupes de composés et sur les différences de stabilité et de charge électrique existant entre les complexes cuivriques des peptides, anioniques, et des acides aminés, cationiques ou neutres.

Nous avons essayé d'améliorer ces méthodes pour rendre cette technique préparative plus rentable. Nous avons utilisé des éluants aqueux non salins et volatiles et une colonne de résine Chelex X-100 qui, en plus de sa forte capacité, permet d'obtenir des acides aminés et des peptides libres de toute trace de cuivre complexant.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### *Préparation de la résine*

Cinquante grammes de résine Chelex X-100 (200-400 mesh) (BioRad, Richmond, Calif., U.S.A.) sont complexés au cours d'une agitation magnétique de 15 h dans 250 ml de  $\text{CuCl}_2$  1 M. La résine est lavée sur filtre de verre fritté par 20 à 30 l d'eau distillée. On vérifie que le filtrat ne contient plus la moindre trace de cuivre par l'addition de diéthylthiocarbamate de sodium en solution méthanolique (3.5 g pour 100 ml). Tout le cuivre libre étant éliminé, la résine est agitée pendant 15 h dans 500 ml d'ammoniaque 3 M. Elle est à nouveau lavée sur filtre de verre fritté avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne une valeur de  $10.3 \pm 0.1$ .

### *Remplissage de la colonne*

Avant de remplir la colonne à chromatographie (hauteur: 27 cm; diamètre: 1.5 cm) avec de la résine ainsi complexée, on introduit de la résine non complexée, uniquement traitée par de l'ammoniaque 3 M. On obtient, au bas de la colonne, un dépôt de 1 cm de hauteur capable de fixer le cuivre éventuellement déplacé de la résine complexée par les divers éluants. La colonne est ensuite remplie par de la résine complexée. Le débit de cette colonne est de 20 ml par heure.

### *Conduite de la chromatographie*

Lorsque les solutions renfermant les constituants à séparer ont pénétré dans la résine, l'éluion est réalisée successivement par 450 ml d'eau distillée, 450 ml d'ammoniaque 1.5 M (pH 11.8) et 350 ml d'ammoniaque 6 M (pH 12.5). Les éluats sont recueillis par fractions de 10 ml. Les substances présentes dans les différents éluats sont repérés en lumière ultraviolette à 280 m $\mu$  et à 230 m $\mu$  en l'absence de toute absorption spécifique. Les fractions obtenues sont lyophilisées et stockées au congélateur avant l'analyse de leurs contenus. On peut régénérer la résine en faisant passer de l'eau distillée sur la colonne jusqu'à ce que le pH de l'éluat présente une valeur de  $10.3 \pm 0.1$ . Il est toutefois plus rapide de retirer la résine de la colonne, de l'équilibrer à pH 10.3 en la lavant par de l'eau distillée sur filtre de verre fritté. Cette résine ainsi traitée est utilisable plusieurs mois.

### *Composés étudiés*

On a déposé dans 5 ml d'eau 5  $\mu$ moles des corps suivants: les 18 acides aminés naturels, la cystine, la 4-hydroxyproline et divers peptides (glycyl-alanine, glycyl-tyrosine, glycyl-tryptophane, glycyl-histidine, glycyl-lysine, carnosine, glutathion, prolyl-glycyl-phénylalanine).

Comme application de cette méthode à un milieu biologique, nous avons utilisé un extrait de glandes pinéales (Epiphyses) de mouton, préparé selon une technique décrite précédemment<sup>7,8</sup>. Une poudre lyophilisée d'épiphyses deshydratées par l'acétone est extraite par percolation par du butanol contenant successivement 5 % puis 10 % HCl 0.1 N. Après purification et délipidation de l'extrait, les composés de faible poids moléculaire sont séparés par filtration sur gel de Séphadex G-25 équilibré dans une solution tampon d'acétate de pyridine 0.05 M à pH 5. Cette fraction, lyophilisée, est reprise par de l'eau distillée et déposée sur la colonne de résine Chelex X-100.

### *Analyse des fractions séparées*

Les composés contenus dans les diverses fractions sont identifiées par plusieurs systèmes de chromatographie et d'électrophorèse sur papier: électrophorèse à pH 3.9 dans le système pyridine-acide acétique-eau (30:100:4870) à 400 V pendant 4 h sur papier Whatman No. 1<sup>9</sup>; électrophorèse à pH 1.8 dans de l'acide acétique 5 M, à 400 V pendant 10 h, sur papier Whatman No. 1; électrophorèse à pH 11.7 dans de l'ammoniaque 1 M à 400 V pendant 15 h sur papier Whatman No. 1<sup>9</sup>; chromatographie descendante dans le système butanol-acide acétique-eau (4:1:5) à 30° pendant 10 h sur papier Whatman No. 1<sup>10</sup>.

Après leur migration, les acides aminés et les peptides sont colorés par une solution butanolique acidifiée de ninhydrine à 0.25 g pour 100 ml<sup>11</sup>. La proline est révélée par une solution butanolique acide d'isatine à 0.2 g pour 100 ml<sup>12</sup>, la tyrosine par une solution alcoolique d' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol à 0.1 g pour 100 ml<sup>13</sup>, le tryptophane par de la *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde à 2 g pour 100 ml dans un mélange à parties égales d'éthanol et d'acide chlorhydrique 6 N<sup>14</sup>.

### *Méthodes de dosage quantitatif*

Le taux de récupération des acides aminés élués est déterminé par le dosage à la ninhydrine<sup>11</sup>, celui des peptides par la méthode de O. LOWRY *et al.*<sup>15</sup>.

## RÉSULTATS

*Séparation des composés standard*

L'éluion par l'eau permet d'obtenir deux fractions: la première présente un maximum d'absorption à 230 m $\mu$  au 35<sup>e</sup> ml et elle contient les acides aspartique et glutamique, le glutathion, la glycyl-alanine, la glycyl-tyrosine et la prolyl-glycyl-phénylalanine (Fig. 1). La deuxième fraction, dont l'absorption à 230 m $\mu$  est maximum au 125<sup>e</sup> ml, renferme le glycyl-tryptophane (Fig. 1).

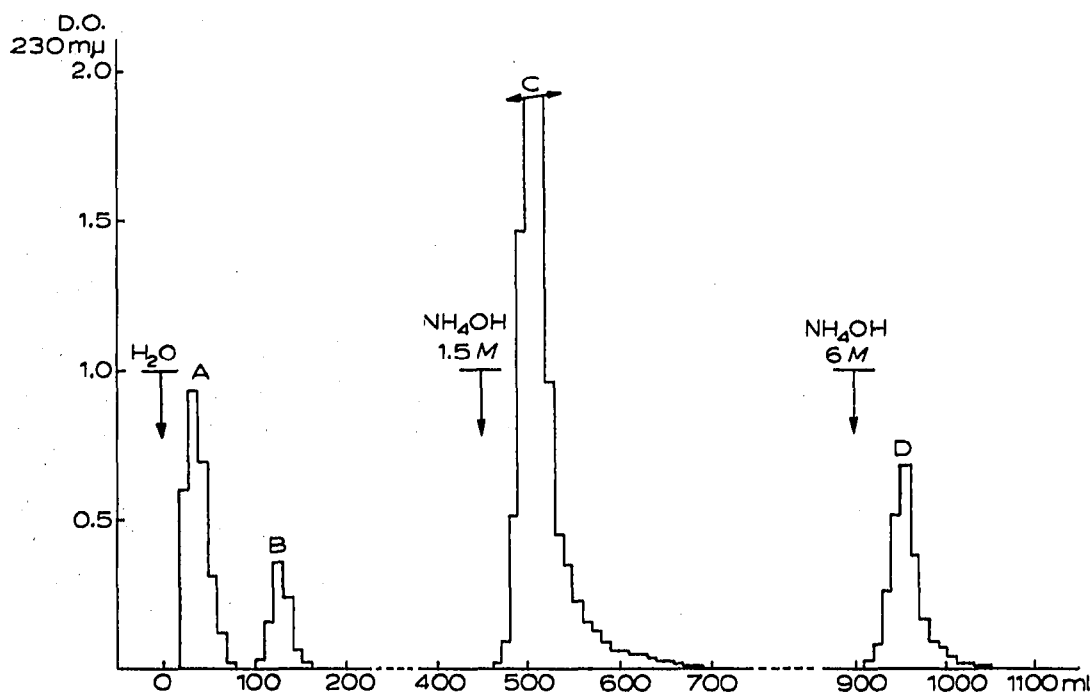


Fig. 1. Séparation de 20 acides aminés naturels et de 9 oligopeptides sur résine Chelex X-100, complexée par des ions cuivriques et équilibrée à pH 10.3. Colonne de 27 cm  $\times$  1.5 cm. Fraction A: éluion des acides aspartique et glutamique, des peptides: glutathion, glycyl-alanine, glycyl-tyrosine, prolyl-glycyl-phénylalanine. Fraction B: éluion du glycyl-tryptophane. Fraction C: éluion des acides aminés neutres (sauf le tryptophane), de la lysine et des peptides: glycyl-histidine, glycyl-lysine, carnosine.

L'éluion par l'ammoniaque 1.5 M entraîne une fraction dont le maximum d'absorption à 230 m $\mu$  se situe au 510<sup>e</sup> ml. Elle contient tous les acides aminés neutres sauf le tryptophane, la lysine et les peptides basiques tels la carnosine, la glycyl-histidine, la glycyl-lysine (Fig. 1).

L'éluion par l'ammoniaque 6 M permet d'obtenir une fraction dont le maximum d'absorption à 230 m $\mu$  se situe au 995<sup>e</sup> ml. Elle contient le tryptophane, l'histidine et l'arginine (Fig. 1).

Le pourcentage de récupération a été déterminé avec un constituant de chaque éluat. Il est de 99.6 % pour le glycyl-tryptophane (éluat aqueux), de 100 % pour la tyrosine (éluat NH<sub>4</sub>OH 1.5 M), de 98.5 % pour le tryptophane (éluat NH<sub>4</sub>OH 6 M).

*Application de la technique au fractionnement d'un extrait épiphysaire*

L'éluat aqueux entraîne trois fractions dont les maxima d'absorption à 230 m $\mu$

se situent respectivement aux 40<sup>e</sup>, 245<sup>e</sup> et 375<sup>e</sup> ml. Trois autres sont éluées par l'ammoniaque 1.5 M. Leurs maxima d'absorption se situent aux 510<sup>e</sup>, 625<sup>e</sup> et 770<sup>e</sup> ml. La dernière élution par l'ammoniaque 6 M entraîne deux fractions dont les maxima d'absorption se situent aux 935<sup>e</sup> et 975<sup>e</sup> ml (Fig. 2).

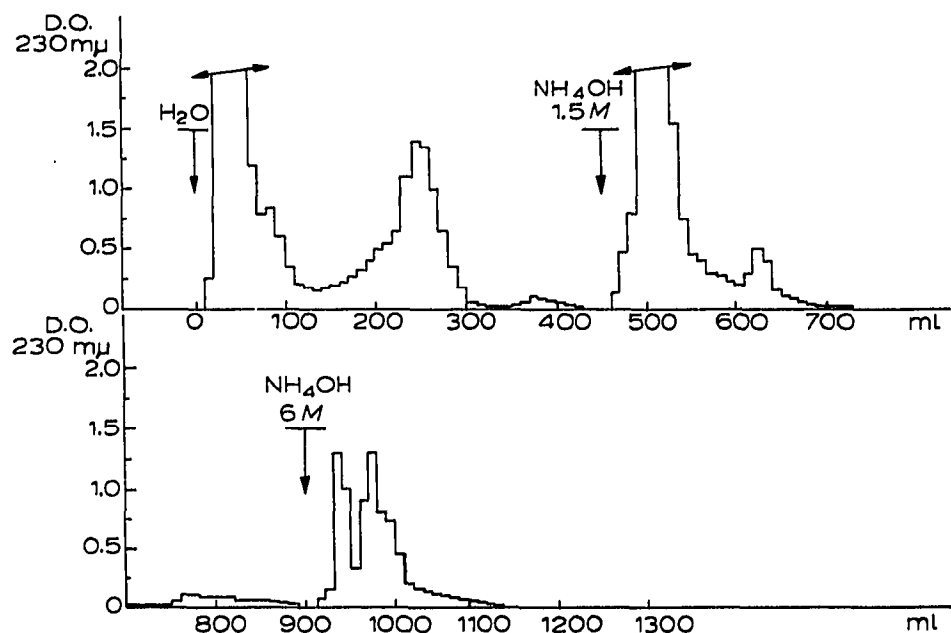


Fig. 2. Fractionnement d'un extrait de glandes pinéales sur une colonne (27 cm × 1.5 cm) de résine Chelex X-100 complexée par des ions cuivriques et équilibrée à pH 10.3.

Le pourcentage de récupération des composés fractionnés est du même ordre que pour les corps témoins. Pour un extrait de glandes pinéales de moutons dont le matériel ninhydrine et LOWRY positif a été dosé, les résultats, exprimés respectivement en mg de leucine et en mg de tyrosine sont indiqués dans le Tableau I.

TABLEAU I

POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION DU MATÉRIEL NINHYDRINE (EXPRIMÉ EN MG DE LEUCINE) ET LOWRY POSITIF (EXPRIMÉ EN MG DE TYROSINE) D'UN EXTRAIT DE GLANDES PINÉALES DE MOUTON

	Leucine (mg)	Tyrosine (mg)
Quantité déposée	96.4	9.77
Éluat H <sub>2</sub> O	12.54	3.39
Éluat NH <sub>4</sub> OH 1.5 M	85.60	5.77
Éluat NH <sub>4</sub> OH 6 M	1.56	1.12
Total récupéré	99.70	10.28
Pourcentage de récupération	103.4%	105%

*Des résultats supplémentaires peuvent être obtenus avec cette technique*

Il suffit d'équilibrer la colonne de résine à un pH moins basique, 8.5 par exemple. On peut, dans ce cas, améliorer sensiblement la séparation des corps élués par l'eau

(Fig. 3). Les trois peptides, glutathion, glycyl-alanine et glycyl-tyrosine, sont séparés convenablement alors qu'ils étaient élués ensemble lorsque la résine était équilibrée à pH 10.3.

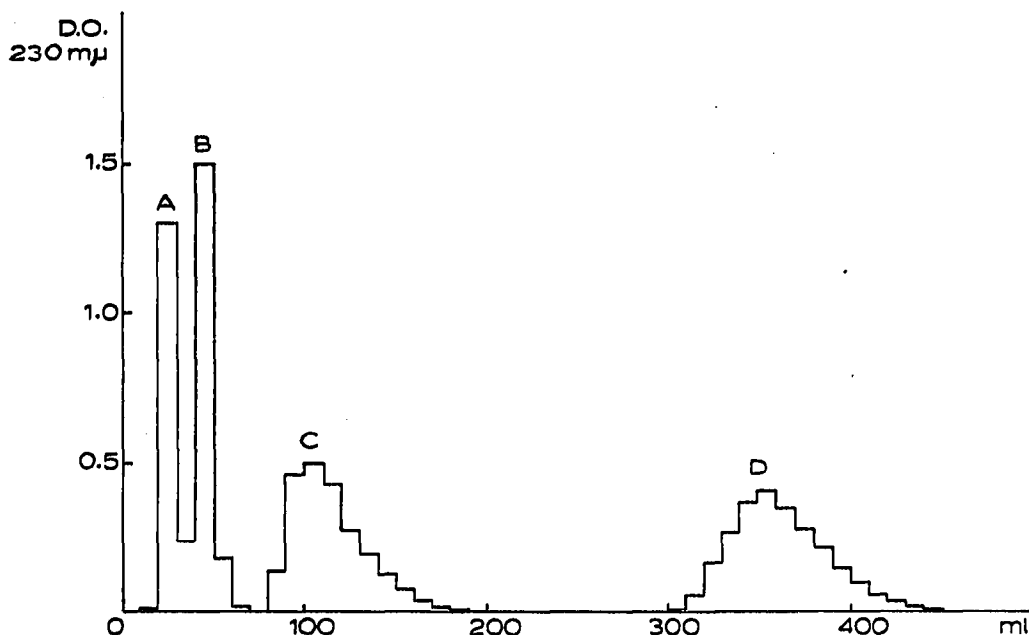


Fig. 3. Séparation des peptides, contenus dans l'éluat aqueux, sur résine Chelex X-100 complexée par des ions cuivriques et équilibrée à pH 8.5. Fraction A: élution du glutathion. Fraction B: élution de la glycyl-alanine. Fraction C: élution de la glycyl-tyrosine. Fraction D: élution du glycyl-tryptophane.

#### DISCUSSION

Les analyses réalisées à partir des composés témoins montrent que les peptides acides et neutres, élués par l'eau, sont séparés des acides aminés neutres et basiques, retenus sur la colonne. Ces peptides peuvent être, en plus l'objet d'un fractionnement si la résine complexée est équilibrée à pH 8.5 au lieu de pH 10.3.

Nous n'avons pas pu obtenir une séparation complète entre les acides aminés et les peptides car les acides aminés acides sont entraînés avec les peptides acides et neutres alors que les peptides basiques sont élués par l'ammoniaque 1.5 M avec l'ensemble des acides aminés neutres. Ces inconvénients ont déjà été signalés dans les travaux précédents<sup>2,3,4</sup>. Cette séparation peut être achevée ultérieurement par des techniques électrophorétiques simples: à pH 3.9, par exemple, on sépare les acides aminés acides des peptides neutres d'une part, les peptides basiques des acides aminés neutres d'autre part. L'analyse de l'extrait de glandes pinéales de mouton a permis de détecter, dans l'éluat aqueux, quatorze peptides dont l'étude structurale est en cours.

Par rapport aux travaux antérieurs<sup>5,6</sup>, cette méthode présente les améliorations suivantes qui la rendent d'un emploi très facile: à la différence du Séphadex cuivrique<sup>1</sup>, la résine Chelex complexée permet, grâce à sa capacité élevée, de traiter des quantités importantes d'extrait. Cet intérêt n'est pas négligeable si on considère la

grande disproportion habituelle entre les quantités de peptides et d'acides aminés présentes dans un milieu biologique.

L'isolement des peptides est une étape qui précède généralement une étude de structure. Il ne faut donc pas risquer de dénaturer ces composés par des conditions de travail trop drastiques. Les peptides acides et neutres sont obtenus à un pH inférieur à 10.3, dans un éluant de très faible force ionique, préférable à une solution de pH 11, presque saturée en tétraborate de sodium<sup>1,4</sup>.

Notre analyse est assez rapide car, si elle dure en tout 48 h, les peptides acides et neutres sont obtenus au bout d'une vingtaine d'heures.

Pour simplifier au maximum cette technique préparative, nous avons préféré à des tampons salins, de forte concentration<sup>1,4</sup>, des éluants faciles à éliminer comme l'eau et l'ammoniaque 1.5 M et 6 M.

L'utilisation d'une résine chargée en cuivre dispense de complexer au préalable les composés à séparer par agitation dans une solution cuivrique<sup>2,3</sup>. Par ailleurs, les produits récupérés dans les éluats sont libres de toute trace de cuivre complexant, ce qui évite les manipulations longues et délicates pour son élimination<sup>1-4</sup>.

Enfin la résine Chelex complexée, facilement régénérée pour une nouvelle analyse, est utilisable plusieurs mois.

#### RESUMÉ

A l'aide d'une résine échangeuse de cations Chelex X-100, complexée par du cuivre, il est possible de séparer des acides aminés la plupart des peptides de faible poids moléculaire.

Cette résine est équilibrée à pH 10.3 par de l'ammoniaque. Les peptides acides et neutres sont élués par de l'eau, les acides aminés neutres et basiques par des solutions d'ammoniaque.

Toutes ces fractions sont obtenues exemptes de cuivre. Les peptides acides et neutres sont contaminés par les acides aminés acides et les peptides basiques par les acides aminés neutres. Des séparations électrophorétiques simples permettent de remédier à ces inconvénients.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. FAZAKERLEY ET D. R. BEST, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 290.
- 2 D. K. J. TOMMEL, J. F. G. VLIAGENTHART ET J. F. ARENS, *Biochem. J.*, 99 (1966) 48 P.
- 3 D. K. J. TOMMEL, J. F. G. VLIAGENTHART, T. J. PENDERS ET J. F. ARENS, *Biochem. J.*, 107 (1968) 335.
- 4 N. R. M. BUIST ET D. O'BRIEN, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 398.
- 5 A. SIEGEL ET E. T. DEGENS, *Science*, 151 (1966) 1098.
- 6 G. GOLDSTEIN, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 477.
- 7 P. JOUAN, A. GARREAU ET S. SAMPÉREZ, *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 26 (1965) 535.
- 8 P. JOUAN, J. BOISSEAU ET E. MORE, *Revue Roumaine Endocrinol.*, 5 (1968) 117.
- 9 G. BISERTE, T. PLAQUET-SCHOONAERT, P. BOULANGER ET P. PAYSANT, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 25.
- 10 S. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 138.
- 11 G. FLEISCHER, *Clin. Chim. Acta*, 9 (1964) 254.
- 12 R. ACHER, C. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- 13 R. ACHER ET C. CROCKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 704.
- 14 J. HARLEY-MASONO ET A. ARCHER, *Biochem. J.*, 69 (1958) 60 P.
- 15 O. LOWRY, N. ROSEBROUCH, A. FARR ET R. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.