STÉROÏDES SURRÉNALIENS TECHNIQUES PRÉPARATOIRES A LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

par

H. CHALOPIN

Laboratoire de Physiologie des Hormones et des Vitamines, Paris et Service de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de Madagascar.

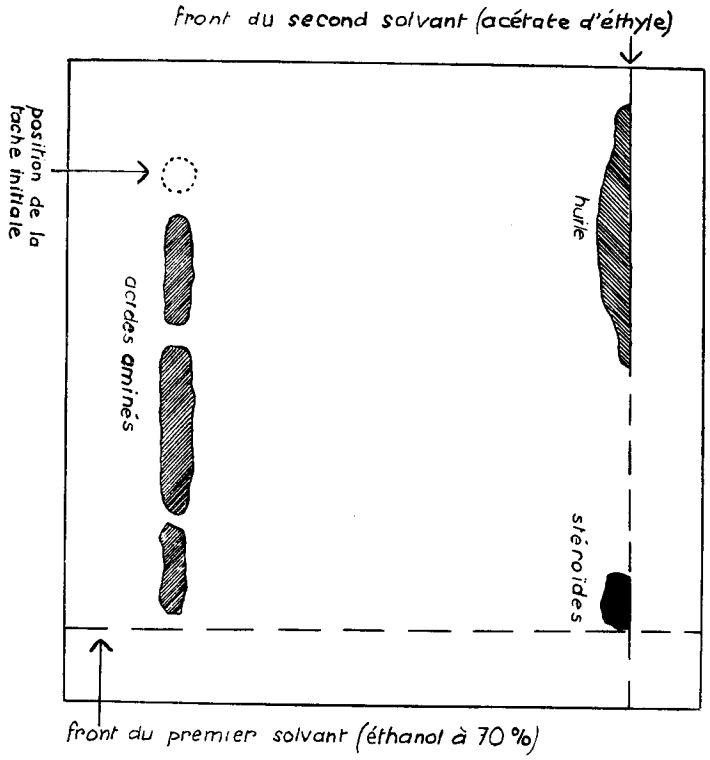
Le but du travail est la préparation des stéroïdes surrénaliens à partir de très petites quantités de matériel biologique, de quelques dizaines ou quelques centaines de milligrammes de tissus frais.

Nous voulons, en outre, conserver dans la préparation la plus grande variété possible de stéroïdes, ce qui nous empêche d'employer les méthodes d'adsorption classiques, destinées à la séparation de certains d'entre eux comme la cortisone ou l'hydrocortisone, mais permettant difficilement de récupérer les autres.

Nous choisissons la méthode la plus habituelle de préparation : elle consiste à éliminer les substances gênantes en dissolvant successivement les stéroïdes naturels dans divers solvants. Il faut naturellement employer tout au long de la purification des quantités de solvants proportionnelles au poids du tissu extrait. Les volumes ainsi définis de solvants au surplus volatils rendent impraticable l'usage de verrerie de capacité et de forme habituelles. Aussi cherchons-nous, dès les premiers stades de la préparation, à remplacer le récipient en verre par le papier à chromatographie imbibé d'un solvant.

On peut séparer les stéroïdes, une huile et des acides aminés, sur le papier à chromatographie : on prend une solution de stéroïdes et d'acides aminés dans l'alcool, on émulsionne une goutte d'huile et on dépose une goutte sur le papier à chromatographie, on laisse évaporer. On entoure ensuite la tache formée d'alcool à 70° et on

fait aussitôt une chromatographie avec le même alcool. Les acides aminés se chromatographient entre le front et le départ, l'huile reste à sa position initiale. On laisse évaporer et on fait une seconde chromatographie par l'acétate d'éthyle en atmosphère humide et dans une direction perpendiculaire à celle de la première. L'huile se porte à une extrémité du front, les stéroïdes à l'autre, les acides aminés ne se déplacent pas. On a ainsi séparé les lipides, les acides aminés et les stéroïdes (fig. 1).

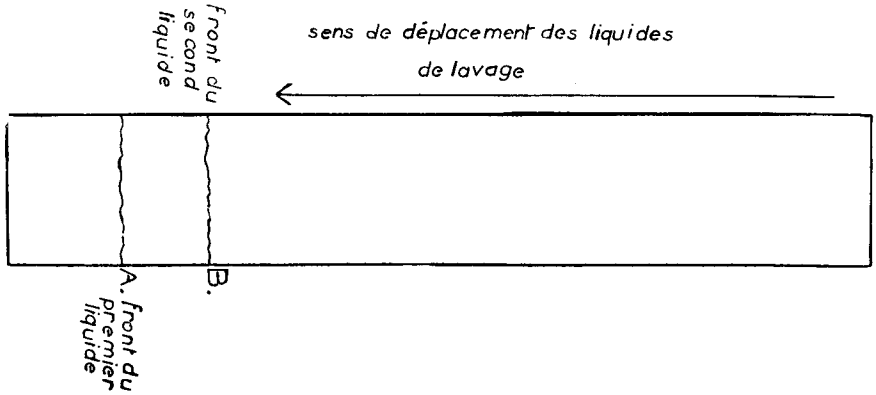


Pourtant les conditions particulières à la purification mettent quelques phénomènes en évidence. On pense d'abord à l'adsorption inégale des divers stéroïdes sur le papier qui peut les séparer et les alterner avec diverses impuretés. Mais on peut choisir des solvants tels que le rF de tous les cortico-stéroïdes soit pratiquement le même, très proche de 0 (solutions aqueuses concentrées de sulfate d'ammonium), ou très proche de 1, l'éthanol (1). Le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle se comportent comme l'éthanol. Par contre, le toluène et l'eau permettent une analyse capillaire des stéroïdes.

Une seconde difficulté propre au travail sur le papier est la reprise quantitative des éléments solubles d'une tache séchée par un liquide différent de celui qui vient de s'évaporer. En effet, certains solvants polaires, quand ils se volatilisent, fixent au papier une partie importante de chacun des corps constituant le résidu sec, les préservant de l'action ultérieure d'un liquide moins polaire (2).

Mais le choix de l'ordre des solvants successifs et l'humidification de l'atmosphère permettent d'éviter un abaissement notable du rendement.

Une autre conséquence de l'emploi du papier mérite l'attention : si l'on dissout sur le papier divers corps dont le rF dans le solvant est 1 (ou très proche de 1), les premières fractions se saturent de chacun des corps jusqu'à épuisement de chacun d'entre eux, de sorte que très près du front la solution est à peu près saturée de tous les corps. Mais, un peu plus loin, on ne rencontre plus que les substances moins solubles ou plus abondantes qui n'ont pas été épuisées par le solvant. Les substances en très petites quantités (comme les hormones) se rassemblent en totalité au front, ce qui peut permettre de les séparer des impuretés plus aisément qu'*in vitro*. Par contre, le papier lui-même apporte des impuretés. La plupart d'entre elles se portent au front du liquide et on les épuise difficilement par des lavages préalables. Aussi la purification du papier, l'un des temps les plus importants du travail, mérite une étude dont nous donnons un exemple ici.



On coupe des bandes de papier à chromatographie (Papier Durrieu, n° 122) non lavé. On le place dans une cage à chromatographie où on fait progresser un premier liquide par capillarité jusqu'en A (fig. 2). On évapore, puis on lave une seconde fois de la même façon dans le même sens, avec un autre solvant qui progresse seulement jusqu'en B. On révèle ensuite les impuretés

« gênantes », c'est-à-dire les substances révélables par les moyens physiques ou chimiques de détection des stéroïdes (Scanner de Haines) (3) — bleu de tétrazolium (4), réaction de Busch (fluorescence en présence de la soude) (5), etc. Nous ne donnons ici que les résultats obtenus en révélant au bleu de tétrazolium.

Nous avons utilisé 6 solvants : eau, éthanol, acétone, acétate d'éthyle, chloroforme, toluène et les 36 combinaisons de deux de ces solvants consécutifs. On remarquera que le premier front A est respecté par le second liquide mais que toute la bande de papier a été en contact avec les vapeurs de chacun des liquides.

A. — Le premier liquide est l'eau. Son front se colore en présence du sel de tétrazolium.

Le front du second liquide ne se colore pas même si ce liquide est l'eau.

B. — Le premier liquide est l'éthanol. Il y a une traînée faiblement colorable en arrière du front A.

Le front B n'est pas colorable, sauf parfois si le second solvant est l'eau ou l'acétone.

C. — Le premier liquide est l'acétone. Le front A n'est pas colorable.

Le front B est colorable seulement si le second liquide est le chloroforme ou l'eau.

D. — Le premier liquide est le chloroforme. Le front A n'est colorable que si le second solvant est l'acétone.

Le front B n'est colorable que si le second solvant est l'eau.

E. — Le solvant est l'acétate d'éthyle. Le front A ne se colore pas.

Le front B se colore si le second liquide est l'eau.

F. — Le premier solvant est le toluène. Le front A ne se colore pas.

Le front B se colore si le second liquide est l'eau.

Le paragraphe A montre que l'eau est un bon solvant pour le lavage du papier.

Le paragraphe B peut s'interpréter si l'on admet que l'éthanol dissout peu les corps réducteurs des sels de tétrazolium.

Le paragraphe C indique que l'acétone nettoie mal le papier qui peut être lavé ensuite par l'eau, mais la succession de l'acétone et du chloroforme fait apparaître probablement une substance réductrice. Ceci est confirmé par le paragraphe D.

Le paragraphe D montre que le chloroforme n'extrait pas de corps réducteurs. Il indique aussi que seule l'eau extrait des corps réducteurs après le chloroforme et confirme une remarque faite au paragraphe C.

Le paragraphe E montre que l'acétate d'éthyle n'extrait pas de corps réducteurs. Seule l'eau en extrait par la suite.

Le paragraphe F montre que le toluène se comporte comme l'acétate d'éthyle.

D'autre part, on cherche à repérer les substances extraites du papier à chromatographie par chacun des divers solvants. Pour cela, on lave un échantillon de papier par un solvant, un autre échantillon par un autre solvant, etc. Le lavage est opéré par « Chromatographie descendante » et on recueille le liquide qui tombe. On le concentre et au moyen de chacun des six liquides concentrés on fait six taches. On chromatographie (analyse capillaire) par chacun des six solvants. Voici les résultats :

1. *Extrait aqueux de papier.*

   a) Après chromatographie par l'eau, la bande de papier réduit le sel de tétrazolium à la place du front du liquide mobile.
   b) Chromatographie par l'éthanol.
   Longue traînée atteignant le front.
   c) Acétone. Réduction au départ.
   d) Chloroforme. Pas de réduction.
   e) Acétate d'éthyle : réduction au-dessus du départ.
   f) Toluène : pas de réduction.

2. *Extrait de papier par l'éthanol à* 98 %.

   a) Chromatographie par l'eau : réduction au front.
   b) L'éthanol : pas de réduction.
   c) Acétone : trace au départ.
   d) Chloroforme : pas de réduction.
   e) Acétate d'éthyle : réduction au-dessus du départ.
   f) Toluène : trace au départ.

3. *Extrait acétonique de papier.*

   a) Chromatographie par l'eau : réduction au front.
   b) Ethanol : traînée.
   c) Acétone : au front.
   d) Chloroforme : au départ.
   e) Acétate d'éthyle : au-dessus du départ.
   f) Toluène : trace au départ.

4. *Extrait chloroformique.*

   a) Chromatographie par l'eau : réduction au front.
   b) Alcool : pas de réduction.

c) Acétone : trace à l'origine.
d) Chloroforme : pas de réduction.
e) Acétate d'éthyle : pas de réduction.
f) Toluène : pas de réduction.

5. *Extrait par l'acétate d'éthyle.*

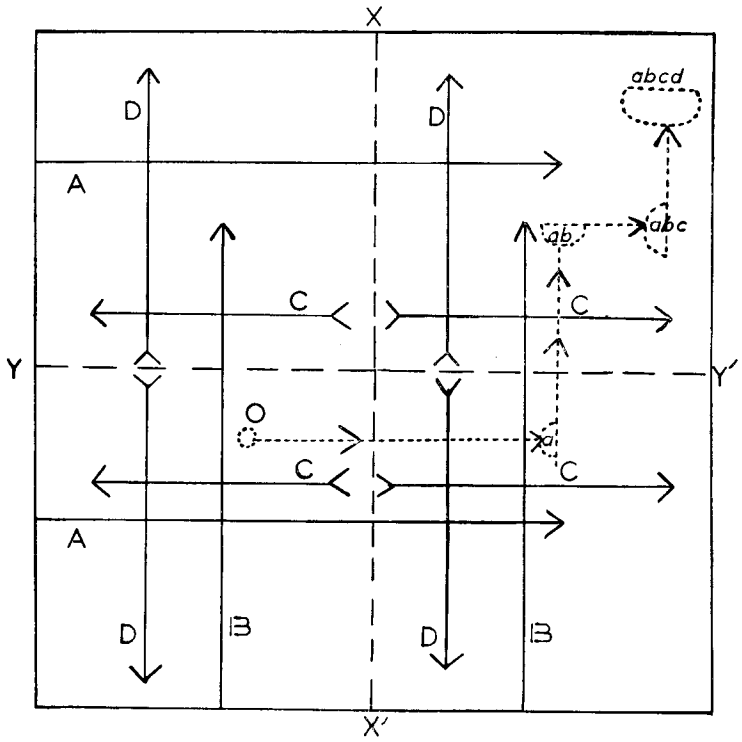
a) Chromatographie par l'eau : réduction au front.
b) Alcool : pas de réduction.
c) Acétone : pas de réduction.
d) Chloroforme : pas de réduction.
e) Acétate d'éthyle : pas de réduction.
f) Toluène : pas de réduction.

6. *Extrait par le toluène.*

a) Chromatographie par l'eau : réduction à rF = 0,5.
b) Alcool : pas de réduction.
c) Acétone : trace au départ.
d) Chloroforme : pas de réduction.
e) Acétate d'éthyle : trace au départ.
f) Toluène : pas de réduction.

On notera que la chromatographie par le chloroforme fait disparaître les corps réducteurs, sauf en ce qui concerne l'extrait acétonique de papier à chromatographie. Mais, dans tous les cas, le front du chloroforme est exempt des corps réducteurs du papier et c'est précisément au front que se portent les stéroïdes.

Aussi aurait-on avantage à terminer une préparation sur le papier par une chromatographie au chloroforme si le chloroforme ne détruisait pas au contact du papier une partie des stéroïdes. Mais on peut également terminer par le passage d'une solution aqueuse concentrée de sulfate d'ammonium ou de sodium. Les corps réducteurs sont entraînés, mais les stéroïdes ne se déplacent presque pas.



La figure 3 montre le schéma de la purification d'un extrait biologique. On prend une feuille de papier chromatographique de 30 cm. de côté. On dépose en 0 l'extrait de tissu qu'on a pu enrichir d'un stéroïde dont on veut vérifier le comportement. On laisse sécher. On fait passer le premier solvant A suivant la direction des flèches A et jusqu'à leur extrémité. Les substances solubles dans A et dont le rF est très proche de 1 vont en A. On évapore le solvant qui imprègne le papier. Puis on fait passer le solvant B suivant les flèches B. On évapore. On coupe le papier suivant xx', puis on fait passer le solvant C sur chacun des morceaux de papier. On sèche encore. On coupe chacun des deux fragments (suivant yy'). On utilise ensuite le solvant D. Les corps dont le rF est 1 dans chaque solvant (les stéroïdes en particulier) se trouvent en (abcd). Ils ont suivi le parcours indiqué par la ligne interrompue et ses flèches. On peut déceler dans diverses autres régions de la feuille de papier de nombreuses substances qui se sont séparées par analyse capillaire. On élue ensuite la région (abcd) et on chromatographie dans un système classique à deux phases liquides (4 à 8).

Résumé. — Il est possible de traiter les corticostéroïdes d'un milieu biologique sur le papier à chromatographie dès les premières opérations. On indique ici certaines des difficultés de la méthode et les moyens de les éviter.

BIBLIOGRAPHIE

1. Chalopin (H.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 393.
2. Chalopin (H.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 1539.
3. Haines (W. J.). — *Recent Progr. in Hormon. Res.*, 1952, 7, 255.
4. Zaffaroni (A.) et Burton (R. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 749.
5. Bush (I. E.). — *Biochem. J.*, 1952, 50, 372.
6. Pechet M. M.). — *Science*, 1955, 121, 39.
7. Romani (J. D.). — *Presse Médicale*, 10 mai 1958.
8. Dyrenfurt (H. I.) et Venning (H. E.).— 1959, End., 64, 648.