

REFERENCES

- 1 T. NAKAMURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 538.
- 2 T. NAKAMURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 44.
- 3 T. NAKAMURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 640.
- 4 B. G. MALMSTRÖM, R. MOSBACH AND T. VÄNNGÅRD, *Nature*, 183 (1959) 321.
- 5 P. W. DAVIES AND F. BRINK, JR., *Rev. Sci. Instr.*, 13 (1942) 524.
- 6 I. M. KOLTHOFF AND J. J. LINGANE, *Polarography*, Interscience Publishers, New York, 1952, p. 399.
- 7 B. CHANCE, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 383.
- 8 B. CHANCE, *Rev. Sci. Instr.*, 22 (1951) 619.
- 9 B. CHANCE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 22 (1949) 224.
- 10 A. S. BRILL, H. DEN HARTOG AND V. LEGALLAIS, *Rev. Sci. Instr.*, 29 (1958) 383.
- 11 A. S. BRILL, H. DEN HARTOG AND V. LEGALLAIS, *Rev. Sci. Instr.*, 29 (1958) 242.
- 12 P. SELWOOD, *Magnetochemistry*, 2nd ed., Interscience Publishers, New York, 1956, p. 246.
- 13 B. CHANCE, *J. Biol. Chem.*, 151 (1943) 553.
- 14 C. WARBURG, *Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action*, Oxford Clarendon Press, 1949, p. 181.
- 15 K. V. THIMANN, C. S. YOCUM AND D. P. HACKETT, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53 (1954) 239.
- 16 B. CHANCE, in W. D. McELROY AND B. GLASS, *The Mechanism of Enzyme Action*, Johns Hopkins Press, 1954, p. 391.

Biochim. Biophys. Acta, 42 (1960) 499-505

NOUVELLE MÉTHODE DE PURIFICATION DE LA GONADOTROPINE CHORIALE HUMAINE

RENÉ GOT ET ROLAND BOURRILLON

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine, Paris (France)

(Reçu le 21 Janvier 1960)

SUMMARY

A new method of purification of human chorionic gonadotropin

Human chorionic gonadotropin is purified up to 12,000 IU/mg, from urine of pregnant women, by a new method of preparation. After benzoic acid adsorption and extraction in an acetate buffer of pH 4.8, the method involves a fractionation with calcium in 50 % ethanol and a precipitation at the pH. Kaolin adsorption and chromatography on Decalso columns yield a fraction at a titre of 7,000 IU/mg.

A further purification by chromatography on Dowex 2 columns or starch electrophoresis gives a final preparation of 10,000 to 12,000 IU/mg, which behaves as a homogenous substance in a physicochemical test for purity.

INTRODUCTION

L'étude des caractéristiques physico-chimiques d'une hormone protéique est subordonnée à l'obtention d'une substance pure. Aussi, les méthodes d'extraction et de purification de la gonadotropine choriale humaine se sont-elles succédées depuis trente ans.

Biochim. Biophys. Acta, 42 (1960) 505-512

La plupart de ces méthodes sont basées essentiellement sur deux procédés: d'une part, l'adsorption benzoïque¹, suivie de fractionnement par les solvants organiques; GURIN, BACHMAN ET WILSON², puis CLAESSEN, HOGBERG, ROSENBERG ET WESTERMAN³ utilisèrent ce procédé pour obtenir des hormones hautement purifiées.

D'autre part, l'adsorption sur Permutite, qui, effectuée directement à partir de l'urine, donnait à KATZMAN, GODFRID, CAIN ET DOISY⁴ une substance identique à celle de GURIN *et al.*².

Cependant, aucune de ces méthodes n'a permis d'obtenir un produit qui titrait plus de 6,000 UI/mg, et dont la pureté ait été parfaitement démontrée.

L'hormone issue de notre méthode de purification atteint 12,000 UI/mg, et sa pureté a été montrée par plusieurs critères⁵.

MÉTHODES ET RÉSULTATS

Dosage biologique

L'activité biologique a été déterminée par l'augmentation de poids des vésicules séminales⁶ chez le rat mâle impubère. Les animaux, âgés de 21-23 jours et pesant de 25 à 30 g, recevaient trois injections de 1 ml en trois jours. Les fractions à titrer et le témoin étaient solubilisés dans le sérum physiologique au moment de l'injection. Les doses injectées étaient d'une à deux Unités Internationales; les animaux étaient sacrifiés le quatrième jour. En général, dix animaux étaient utilisés pour chaque fraction. Les produits correspondant à la fin des préparations ou à certains stades particulièrement importants étaient dosés par un essai quatre points.

Sources et hormone brute

La découverte par BROWNE ET VENNING⁷, confirmée par EVANS, KOHLS ET WONDER⁸, d'un maximum d'excrétion de la gonadotropine choriale dans l'urine, devait permettre aux chercheurs d'utiliser une matière première plus riche: l'urine recueillie aux alentours du soixantième jour de grossesse.

De telles urines ont pu être utilisées, mais en quantité relativement faible (quelques dizaines de litres): elles titraient environ 30,000 UI/l.

Les principales préparations ont été effectuées sur des mélanges d'urines recueillies entre le 60^{ème} et le 90^{ème} jour de grossesse: le titre variait entre 8,000 et 12,000 UI/l.

Les urines étaient stockées en chambre froide sur merthiolate.

L'extraction de l'activité gonadotrope, à partir de ces urines, était effectuée selon la méthode d'adsorption sur l'acide benzoïque de KATZMAN ET DOISY¹. Le produit obtenu était extrait à 4° par un tampon acétate $M/15$, de pH 4.8. Un insoluble important et pratiquement inactif était ainsi éliminé. Une précipitation par 80 % d'acétone permettait d'obtenir une hormone brute (produit P) contenant la quasi totalité de l'activité initiale.

Des exemples du produit P sont donnés dans le Tableau I.

Extraction hydro-alcoolique

Par analogie avec la technique de fractionnement des mucopolysaccharides employée par MEYER *et al.*^{9,10}, on pouvait tenter de séparer les mucoprotéines urinaires en se fondant sur la différence de solubilité de leurs sels de calcium. Le produit P était extrait ainsi par l'éthanol à 50 % dans un tampon acétate $M/15$, de pH 4.5,

contenant une concentration molaire 0.015 M d'un sel de calcium, chlorure ou acétate. L'extraction était effectuée en trois fois, avec agitation mécanique, à 4°, par un volume total de x ml, pour une quantité 10 x mg de P. L'insoluble, pratiquement inactif était éliminé, la solution surnageante était amenée à une concentration alcoolique de 80 %: on retrouvait dans le précipité obtenu l'essentiel de l'activité initiale, ainsi qu'en témoignent les exemples rassemblés dans le Tableau I.

TABLEAU I

EXTRACTION HYDRO-ALCOOLIQUE DE LA GONADOTROPINE CHORIALE EN PRÉSENCE DE CALCIUM

UI/l d'urine	P				Insoluble à 50 % d'éthanol en présence de calcium			Produit final		
	Poids total	Poids/l	UI/mg	UI (total)	Poids	UI/mg	UI (total)	Poids	UI/mg	UI (total)
27,000	1,000	22	963	963,000	722	124	90,000	106	5,425	545,000
23,000	785	27	700	549,500	380			312	1,670	521,000
24,000	826	20	1,200	991,000	360	149	53,640	392	2,250	882,000
	760				310	53	16,430	180	2,400	432,000
14,000	1,195	12.5	960	1,147,000	625	145	90,625	430	2,250	967,000
11,500	33,800	19	550	18,600,000	20,400	100	2,040,000	7,980	1,820	14,523,000
8,500	60,000	57	135	8,100,000	52,000	20	1,040,000	5,760	1,200	6,910,000
9,500	4,000	24.5	350	1,715,000	2,966	37	109,700	1,320	1,120	1,452,000

La lecture de ce Tableau montre que l'activité de l'hormone brute P est d'autant plus élevée que l'on part d'une urine plus riche. Cependant, après cette extraction hydro-alcoolique, l'activité spécifique des produits obtenus ne varie que dans des limites assez restreintes, quelque soient la quantité et la richesse des urines utilisées.

A ce stade de la préparation, le rendement est voisin de 80 %.

Précipitation au pH

Cette extraction hydro-alcoolique était complétée par une précipitation sélective de l'hormone à son pH.

Le produit hormonal provenant du stade précédent était dissous, à une concentration de 1.5 %, dans une solution d'acide acétique ajustée pH 3. Un précipité, obtenu en amenant la solution à une concentration de 60 % en éthanol, contenait l'activité gonadotrope; la purification était d'environ 50 %.

Adsorption sur kaolin

Le kaolin est fréquemment utilisé pour l'extraction des gonadotropines par adsorption à partir de l'urine normale. Son emploi dans la purification de la gonadotropine choriale, à un stade relativement avancé de la préparation, n'a jamais été signalé. L'hormone était adsorbée à pH 4.5 et élue par une solution ammoniacale de pH 11.5: 1 ml d'une suspension de kaolin à 20 % pouvait adsorber 10,000 UI. Le titre des précipités acétoniques obtenus à partir de cet éluate ammoniacal neutralisé, dépassait dans la plupart de nos préparations, 3,500 UI/mg. La purification était de 100 %, avec un rendement toujours supérieur à 90 %.

Le Tableau II donne quelques exemples de la purification obtenue par adsorption sur kaolin à partir du produit précipité au point isoélectrique.

TABLEAU II
ADSORPTION SUR KAOLIN DU PRODUIT PRÉCIPITÉ AU pH I DE L'HORMONE

Poids (mg)	Produit adsorbé		Produit élue		
	UI/mg	UI (total)	Poids (mg)	UI/mg	UI (total)
1,54	2,920	4,50,000	79	5,200	410,000
2,400	1,900	4,560,000	1,130	3,650	4,125,000
3,500	1,840	6,440,000	1,730	3,450	5,970,000
800	1,260	1,008,000	275	3,520	968,000
200	2,580	516,000	122	4,000	488,000

Chromatographic sur Décalso

Les hormones élues du kaolin avaient des activités très voisines, 3,500 à 4,000 UI/mg cependant, l'électrophorèse libre montrait qu'elles étaient encore très impures (Fig. 1a).

Une chromatographie d'adsorption sur colonne de Décalso devait permettre de doubler cette activité. Le Décalso est un silicate synthétique de sodium et d'aluminium. Tamisé entre 80 et 100 mesh, il avait subi préalablement un cycle comportant un traitement par la soude normale, un lavage à l'eau, un traitement par l'acide acétique 0,25 N, un nouveau lavage à l'eau. Le Décalso était alors mis en colonne et lavé par le tampon utilisé au cours de l'adsorption, jusqu'à ce que le pH de l'effluent soit identique à celui du tampon. Une étude systématique avait permis de déterminer le pH et le tampon les plus favorables à la purification et au rendement de l'opération: c'était le tampon acétate 0,05 M de pH 5,4.

La capacité d'adsorption du Décalso est évidemment fonction du degré de pureté de l'hormone utilisée. Dans le cas présent, l'hormone titrant 3,000 à 4,000 UI/mg, la capacité du Décalso est d'environ 12,500 UI/g: ainsi, 80 g de Décalso étaient suffisants pour traiter 1,000,000 d'Unités, soient 250 à 300 mg du produit hormonal élue du kaolin. Cette quantité correspondait à des colonnes de 20 × 3 cm. La section importante des colonnes utilisées, 7 cm² permettait un écoulement plus rapide: toutes les chromatographies furent terminées en 8 h, adsorption et élution comprises. Le contact entre le Décalso et l'hormone doit être bref, afin d'éviter des dénaturations ou des adsorptions irréversibles.

La concentration en protéine des fractions collectées à la sortie de la colonne était suivie par un dosage spectrophotométrique à 278 m μ . Dès que l'absorption dans l'u.v. redevenait nulle, l'élution était commencée: la fraction active devait être déplacée à un pH supérieur au pH d'adsorption. Pour réaliser cette élution dans un faible volume sans monter à un pH trop alcalin nuisible à l'hormone, il était nécessaire d'utiliser une solution à force ionique élevée, qui neutralisait rapidement le Décalso. Après divers essais, une élution rapide et quantitative fut obtenue par une concentration d'acétate d'ammonium de 10 % dans l'éthanol à 40 %; l'éthanol permettait de diminuer les quantités de protéines inactives éluees avec l'hormone.

La Fig. 2 est le schéma d'une chromatographie d'adsorption sur Décalso. Elle nous montre qu'une faible proportion des protéines n'était pas adsorbée et que la purification était surtout obtenue par élution fractionnée, un pourcentage important de protéines inactives n'étant élue que par des solutions très alcalines.

Cette opération permettait d'obtenir, par précipitation alcoolique des fractions

Schéma de la préparation de la Gonadotropine Choriale Humaine.

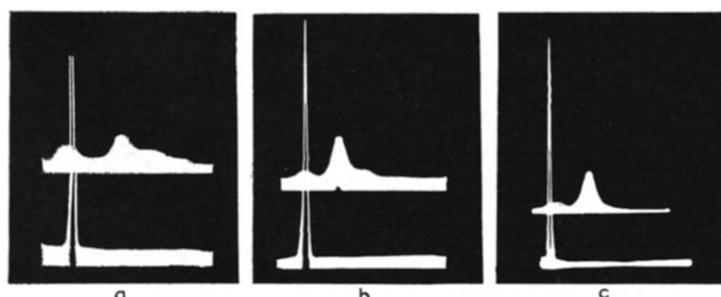
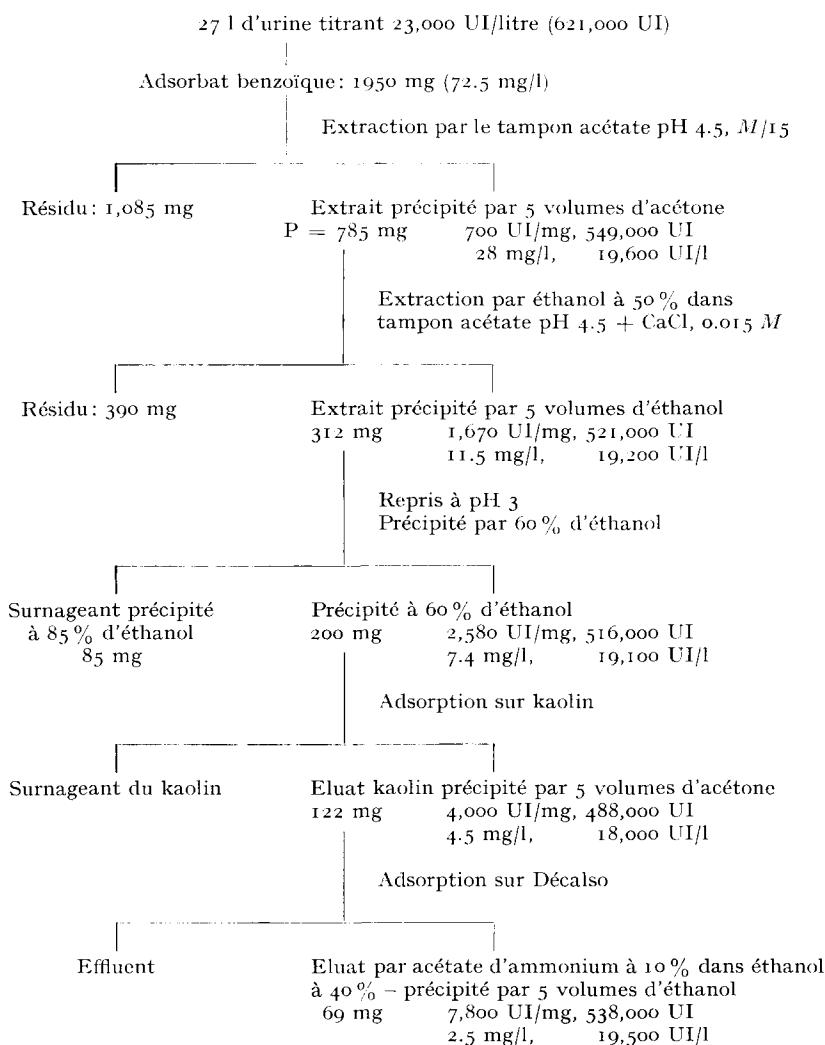


Fig. 1. Electrophorèses libres de préparations hormonales correspondant à différents stades de pureté. pH 8.6, 7,200 sec, 9.2 V/cm, $\mu = 0.1$. a, 3,800 UI/mg; b, 7,000 UI/mg; c, 12,000 UI/mg.

éluées, une hormone titrant 7,000 à 8,000 UI/mg. Le rendement était proche de l'unité.

Grâce à des procédés originaux par leur utilisation présente, la méthode de préparation (schématisée dans le diagramme ci-contre) aboutissait à une hormone d'un titre ($9,200 > 7,500 > 5,700$, $P = 0.05$) supérieur au titre des hormones les plus actives préparées jusqu'alors. Cependant, cette hormone n'était pas encore homogène à l'électrophorèse (Fig. 1b).

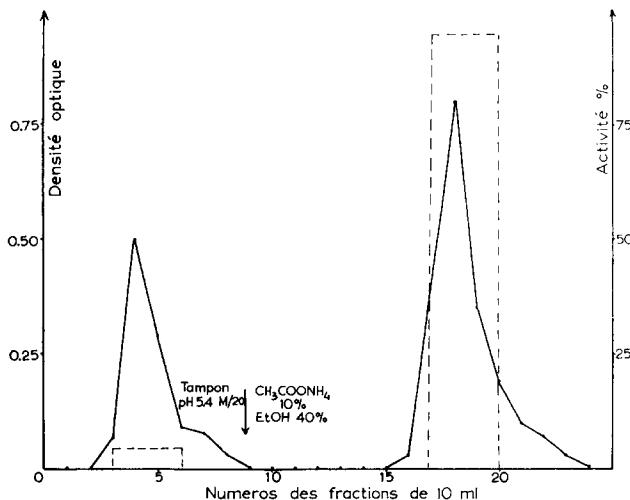


Fig. 2. Chromatographie sur Décalso d'une préparation titrant 3,800 UI/mg. —, densité optique à $278 \text{ m}\mu$; - - - - - , rendement en % de l'activité initiale.

Obtention de l'hormone pure

Deux procédés ont permis d'obtenir la purification nécessaire.

Chromatographie sur Dowex 2: La technique utilisée est celle préconisée par BOMAN ET WESTLUND¹¹, pour la séparation de divers enzymes. Après traitement par l'acide chlorhydrique normal, la résine était tamponnée par un tampon "Tris" de pH 7.3 (voir réf. 12), et mise en colonne; une colonne de $20 \times 2 \text{ cm}$ suffisait pour un million d'Unités (40 g de résine). L'hormone, dissoute dans le tampon "Tris" 0.04 M, n'était pas adsorbée et se retrouvait directement dans l'effluent; seules les impuretés inactives qui la contaminaien encore, s'adsorbaient sur la résine et pouvaient être éluées par des tampons de molarités plus élevées. Le précipité alcoolique obtenu à partir de cet effluent, titrait 11,000 à 12,000 UI/mg. Le rendement de cette chromatographie était de 90 % environ.

Electrophorèse de zone sur colonne d'amidon: L'appareillage et la technique utilisés ont été décrits précédemment^{13,14}. Les électrophorèses étaient effectuées à pH 8.6 en tampon véronal sodique de force ionique 0.05, à 4° , sous une tension de 400 V, avec un courant de 10 à 12 mA, durant 45 à 48 h. La concentration en protéine des fractions éluées des segments d'amidon, était dosée par la méthode de LOWRY *et al.*¹⁵.

Cette technique n'était applicable qu'à des produits possédant une activité spécifique supérieure à 3,500 UI/mg, dans lesquelles la frontière hormonale était bien

définie. En effet, dans des préparations moins pures, l'activité se répartissait sur une zone trop étalée au cours de l'électrophorèse.

La Fig. 3 représente la courbe de concentration protéique en fonction du nombre des segments d'amidon, après une électrophorèse effectuée sur un produit titrant 3,800 UI/mg. Les segments 12 à 19 correspondent aux impuretés inactives, encore présentes en majorité dans un tel produit; l'activité hormonale se trouve concentrée sur un seul pic, le plus lent (la mobilité électrophorétique de l'hormone est faible

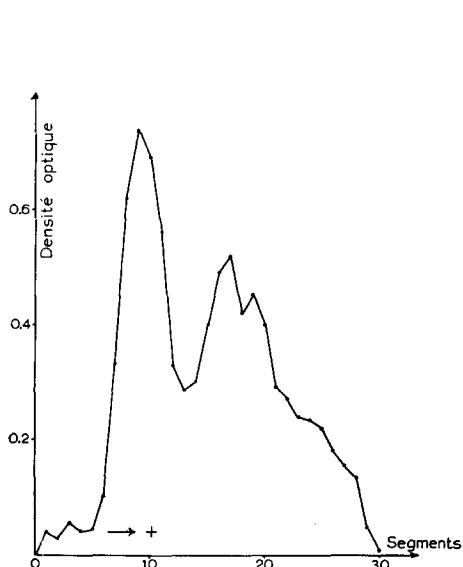


Fig. 3. Electrophorèse de zone sur amidon d'une préparation titrant 3,800 UI/mg.

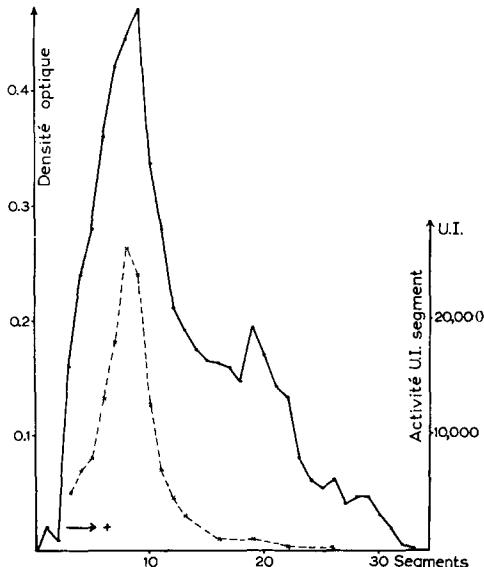


Fig. 4. Electrophorèse de zone sur amidon d'une préparation titrant 7,000 UI/mg. ●—●, concentration en protéine; ×---×, activité biologique.

à pH 8.6: $-2.5 \cdot 10^{-5}$): le précipité obtenu à partir des fractions 7 à 11, pesait 70 mg et titrait 10,800 UI/mg, pour 200 mg de la substance initiale.

Dans une hormone titrant 7,000 UI/mg, on ne trouve plus que 30 à 35 % d'impuretés; sur la Fig. 4 sont tracées les courbes de concentration en protéine et d'activité biologique des fractions électrophorétiques: la courbe d'activité coïncide avec le pic le plus lent et le plus important. Le précipité obtenu à partir des fractions 9 à 12 titrait 11,200 UI/mg, alors que pour les fractions 15 à 26, le précipité était totalement inactif.

Les hormones obtenues par ces deux procédés de purification étaient homogènes à l'électrophorèse (Fig. 1c).

DISCUSSION

La méthode de préparation décrite permet d'obtenir à partir de l'urine de femme enceinte, avec un rendement final de l'ordre de 70 %, une hormone dont l'activité spécifique se situe entre 10,000 et 12,000 UI/mg ($8,700 < 11,500 < 14,500$, $P = 0.05$), activité largement supérieure à celle des produits les plus purs déjà décrits dans la littérature? En effet, la seule gonadotropine choriale qui soit caractérisée sur le plan

physico-chimique, a été préparée par GURIN *et al.*², mais son activité, exprimée en "unités animales" ne dépassait pas 6,000 m.e.d., et son estimation en Unités Internationales est délicate.

Plus récemment, CLAESSEN *et al.*³ avaient préparé une hormone plus active, titrant 6,000 à 8,000 UI/mg mais ils déclaraient extraire 20 mg de cette hormone par litre d'urine, soient 120,000 à 150,000 UI. Or, LORAIN¹⁶ a montré que le maximum d'excrétion de la gonadotropine dans l'urine de femme enceinte est d'environ 50,000 UI/24 h. Ce chiffre a d'ailleurs été vérifié au cours de ce travail. Les chiffres avancés par CLAESSEN semblent donc trop élevés.

L'utilisation du Dowex 2 pour la purification des gonadotropines n'avait jamais été envisagé. L'intérêt de cette méthode réside surtout dans le fait que ce sont les impuretés inactives qui s'adsorbent sur la résine, alors que l'hormone elle-même se retrouve directement dans l'effluent. Cependant, cette technique n'avait toute son efficacité que si elle était appliquée à des substances déjà purifiées.

Enfin, RAACKE, LI ET LOSTROH¹⁷ avaient déjà soumis l'hormone choriale à l'électrophorèse de zone sur amidon; mais, leur étude avait un but analytique. Cependant, le rôle de cette technique est essentiellement préparatif: ainsi, elle a permis d'obtenir une hormone pure identique à celle obtenue par les chromatographies sur adsorbants. L'homogénéité de cette hormone, montrée par électrophorèse, a été confirmée par les principaux critères de pureté des protéines⁵.

RÉSUMÉ

L'obtention d'une gonadotropine choriale humaine titrant 12,000 UI/mg a été réalisé par une nouvelle méthode de préparation. L'hormone est extraite de l'urine de femme enceinte par une adsorption sur acide benzoïque, suivie d'une extraction aqueuse à pH 4.5. Le produit brut ainsi obtenu subit alors une extraction hydro-alcoolique, par l'éthanol à 50 %, en présence de calcium, et l'hormone est précipitée à son pH. Une adsorption sur kaolin, suivie d'une chromatographie d'adsorption sur Décalso, permet d'obtenir une substance titrant 7,000 UI/mg. Une dernière purification par chromatographie sur Dowex 2 ou par électrophorèse de zone sur amidon conduit à la Gonadotropine titrant 10,000 à 12,000 UI/mg et répondant aux principaux critères de pureté.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. A. KATZMAN ET E. A. DOISY, *J. Biol. Chem.*, 98 (1932) 739.
- 2 S. GURIN, C. BACHMAN ET D. W. WILSON, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 525.
- 3 L. CLAESSEN, B. HOGBERG, TH. ROSENBERG ET A. WESTERMAN, *Acta Endocrinol.*, 1 (1948) 1.
- 4 P. A. KATZMAN, M. GODFRID, C. K. CAIN ET E. A. DOISY, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 501.
- 5 R. GOT ET R. BOURRILLON, *Bull. soc. chim. biol.*, 42 (1960) 31.
- 6 E. DICZFALUSY, *Acta Endocrinol.*, 17 (1954) 58.
- 7 J. S. L. BROWNE ET E. H. VENNING, *Lancet*, 2 (1936) 1507.
- 8 H. M. EVANS, C. L. KOHLS ET D. H. WONDER, *J. Am. Med. Assoc.*, 108 (1937) 287.
- 9 K. MEYER, A. LINDER, E. A. DAVIDSON ET B. WEISSMAN, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 611.
- 10 K. MEYER, E. A. DAVIDSON, A. LINDER ET P. HOFFMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 506.
- 11 H. G. BOMAN ET L. E. WESTLUND, *Arch. Biochem. Biophys.*, 64 (1956) 217.
- 12 G. GOMORI, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 62 (1946) 33.
- 13 R. BOURRILLON ET R. GOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 915.
- 14 R. BOURRILLON ET R. GOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 41 (1959) 643.
- 15 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 16 J. A. LORAIN, *J. Endocrinol.*, 6 (1950) 319.
- 17 I. D. RAACKE, C. H. LI ET A. LOSTROH, *Acta Endocrinol.*, 17 (1954) 366.