

N° d'ordre  
42

50376  
1962  
4

Université de Lille — Faculté des Sciences

50.376  
1962  
4

## THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour obtenir le titre d'Ingénieur-Docteur

par

**PAUL-ANDRÉ FINOT**

Ingénieur-Chimiste H. E. I.

Licencié ès-Sciences Physiques (Mention Chimie)

Attaché de Recherche au Centre National  
de la Recherche Scientifique

**Première Thèse**



# Contribution à l'étude de la polycondensation thermique des $\alpha$ -amino-acides

**Deuxième Thèse**

**Propositions données par la Faculté**

Soutenues le 16 Octobre 1962, devant la Commission d'Examen

JURY MM. Jean GERMAIN, Président  
MONTREUIL  
MAUREL  
BISERTE

1962



GLACET, Chimie  
 HEIM DE BALSAC, Zoologie  
 HEUBEL, Chimie  
 HOCQUETTE, Botanique Générale et  
 appliquée  
 KAMPE de FERIET, Mécanique des Fluides  
 LEBEGUE, Botanique  
 LEBRUN, Radioélectricité et électronique  
 LUCQUIN, Chimie minérale  
 MARION, Chimie  
 Mlle MARQUET, Mathématiques  
 M<sup>r</sup>. MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des fluides  
 MONTREUIL, chimie biologique  
 PEREZ, Physique  
 POITOU, Algèbre supérieure  
 N..... Physique générale  
 N ..... Mécanique rationnelle et expéri-  
 mentale  
 SAVARD, Chimie Générale  
 TILLIEU, Physique  
 TRIDOT, Chimie appliquée  
 VIVIER, Zoologie  
 WATERLOT, Géologie houillère  
 WERTHEIMER, Physique

MAITRES DE  
 CONFERENCES

M<sup>r</sup>. BACCNUS, Astronomie  
 BECART, Physique  
 BOURIQUET, Physique  
 BOUISSET, Physiologie animale  
 GELET, Géologie  
 GONTIER, Mécanique des fluides

MM. HERZ, Mathématiques  
LACOMBE, Mathématiques  
Mlle LENOBLE, Physique  
MM. LINDER, Botanique  
LURCAT, Physique  
MAUREL, Chimie  
MENNESSIER, Géologie  
Mlle NAZE, Mathématiques  
MM. POLVECHE, Géologie  
PROUVOST, Géologie  
SCHALLER, Zoologie

CHARGES d'  
ENSEIGNEMENT

MM. LIEBART, Radioélectricité  
SCHILTZ, Physique

SECRETARE : Mme BOUCHEZ

Université de Lille — Faculté des Sciences

---

**THÈSES**

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour obtenir le titre d'Ingénieur-Docteur

par

**PAUL-ANDRÉ FINOT**

Ingénieur-Chimiste H. E. I.

Licencié ès-Sciences Physiques (Mention Chimie)

Attaché de Recherche au Centre National  
de la Recherche Scientifique

---

**Première Thèse**

**Contribution à l'étude  
de la polycondensation thermique  
des  $\alpha$ -amino-acides**

**Deuxième Thèse**

**Propositions données par la Faculté**

---

Soutenues le 16 Octobre 1962, devant la Commission d'Examen

---

JURY MM. Jean GERMAIN, Président  
MONTREUIL  
MAUREL  
BISERTE

**1962**

## AVANT-PROPOS

---

Le présent travail a été effectué avec l'assentiment de Monsieur GERMAIN, Professeur à la Faculté des Sciences, Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur BISERTE, dans le Laboratoire de Monsieur le Professeur BOULANGER, à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille.

Nous prions Monsieur le Professeur GERMAIN d'agréer l'expression de notre respectueuse reconnaissance pour avoir bien voulu superviser l'ensemble de notre travail et accepter la présidence de notre Jury.

Qu'il nous soit permis aujourd'hui d'exprimer à Monsieur le Professeur BOULANGER, toute notre reconnaissance et notre gratitude pour la bienveillance qu'il a toujours témoignée à notre égard, pour la confiance qu'il a bien voulu nous accorder en nous intégrant au sein de son équipe.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur BISERTE qui a constamment dirigé nos travaux et prodigué ses conseils et ses encouragements. Qu'il veuille bien trouver dans l'aboutissement de ce travail, l'expression de notre admiration et de notre respectueuse gratitude.

Nous remercions Monsieur le Professeur MONTREUIL pour la sympathie qu'il a toujours témoignée à notre égard et pour les contacts toujours pleins d'intérêts que nous avons pu avoir au sein du Laboratoire. Nous lui sommes reconnaissant de l'honneur qu'il nous fait de juger ce travail.

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur le Professeur MAUREL qui nous a conseillé dans la partie physico-chimique de notre travail et qui a participé au choix de notre second sujet.

Nous remercions Monsieur FIGACHE, qui a contribué par son enseignement à notre formation et à qui nous devons la mise en route de notre travail.

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur le Professeur DESNUELLE, notre parrain au Centre National de la Recherche Scientifique, dont nous admirons la compétence dans le domaine de la Chimie des Protéines.

Nous tenons à remercier tous ceux qui, par leurs compétences nous ont aidé dans notre travail, en particulier Monsieur le Professeur OSTEUX, Messieurs les Professeurs Agrégés DAUTREVAUX et HAVEZ et Monsieur GUILLAUME.

Nous désirons témoigner notre amitié à tous nos camarades du Laboratoire et adresser nos remerciements à tous les collaborateurs techniques, pour leur sympathie et pour l'aide qu'ils ont prodiguée à notre travail.

## INTRODUCTION

-----

Les  $\omega$ -aminoacides dans lesquels les fonctions amine et acide sont suffisamment éloignées donnent très facilement par chauffage une réaction de polycondensation qui conduit à des polyamides de haut poids moléculaire ; la fabrication des fibres synthétiques à partir de l'acide  $\epsilon$ -aminocaproïque ou de l'acide 11-amino undécanoïque en sont de remarquables exemples.

Les acides  $\alpha$ -aminés naturels ont un comportement très différent. Par chauffage à sec, ils subissent des réactions complexes de désamination, de décarboxylation, de deshydratation, etc... Leur chauffage dans des solvants tels que la glycérine ou l'éthylène glycol, permet la synthèse de dicétopipérazines (SANNIE) (45). Cependant le comportement thermique de deux acides aminés dicarboxyliques, l'acide aspartique et l'acide glutamique, est particulier. L'acide aspartique chauffé vers 200°C se condense en une polyimide qui s'hydrolyse en milieu alcalin, en un acide poly-aspartique (KOVACS) (35), (VEGOTSKY) (28)(29) et (FOX) (20)(21). L'acide glutamique au contraire se cyclise par chauffage à 170°C en sa lactame : l'acide  $\alpha$ -pyrrolidone carboxylique ou acide pyroglutamique (point de fusion 161-162°C) (BEECHAM) (5) (WILSON et CANNAN) (55).

Toutefois HARADA et FOX ont montré récemment que le chauffage (à des températures supérieures à 160°C) de l'acide pyroglutamique en présence d'autres acides  $\alpha$ -aminés permet d'obtenir des produits de condensation qui donnent une réaction du biuret positive. Ce biuret n'apparaît pas quand on remplace l'acide aminé par sa dicétopipérazine (HARADA et al.) (27).

Le chauffage entre 160° et 190°C d'un mélange finement pulvérisé d'acide pyroglutamique et de glyocolle (rapport  $\frac{\text{acide pyroglutamique}}{\text{glyocolle}}$  égal à 1,2 ou 3) conduit à la synthèse de produits insolubles et adialysables dont le poids

moléculaire varie entre 11.000 et 20.000 (HARADA et al.) (27).

En faisant réagir dans les mêmes conditions un excès d'acide pyroglutamique et d'acide aspartique avec un mélange complexe d'acides aminés neutres et basiques, on obtient des produits de condensation qui contiennent tous les acides aminés utilisés. Ils correspondent aux "proténoïdes" de synthèse de FOX et HARADA (18),(19),(20).

La réaction peut être également catalysée par de l'acide phosphorique qui augmente la vitesse de réaction et qui permet d'abaisser la température de condensation (FOX) (20),(21) et (HARADA) (28).

En utilisant la lysine base, seule ou en présence d'autres acides aminés neutres ou acides, on peut obtenir des résines plus ou moins insolubles de structure tridimensionnelle (HARADA) (28)

Au cours de notre travail, nous nous sommes proposé d'étudier la nature et la structure des produits formés au cours de la réaction de polycondensation proprement dite, et les propriétés générales des polypeptides synthétisés par cette méthode.

Ainsi, la structure détaillée de plusieurs peptides a été déterminée par l'analyse et vérifiée par la synthèse. L'influence d'un certain nombre de facteurs (température, temps, rapports molaires des différents réactifs) sur le degré d'avancement de la réaction a été précisé. Un processus de polycondensation est proposé et les ordres de réaction par rapport aux réactifs ont été déterminés.

Le plan de ce travail est le suivant :

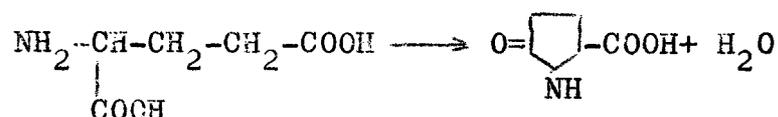
- CHAPITRE I : techniques générales
- CHAPITRE II : Influence d'un certain nombre de facteurs sur la condensation de l'acide pyroglutamique et des amino acides
- CHAPITRE III : Structure des produits de condensation
- CHAPITRE IV : Cinétique
- CHAPITRE V : Condensation thermique des acides aminés basiques
- CHAPITRE VI : Propriétés physiques, chimiques et biologiques

CHAPITRE I  
TECHNIQUES GÉNÉRALES

Les acides aminés utilisés sont des formes racémiques ou des formes naturelles (série L) (\*).

A) PRÉPARATION DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE

L'acide pyroglutamique est préparé simplement par chauffage de l'acide L-glutamique (BEECHAM) (5) au bain d'huile à 170°C pendant 2 heures



L'acide pyroglutamique ainsi préparé (point de fusion 147°C) donne une légère réaction du biuret. La purification de l'acide pyroglutamique est obtenue par cristallisation dans l'éthanol. Après une première cristallisation, le point de fusion du produit est de 156°C. Après une deuxième cristallisation, celui-ci est de 159-160°C. La liqueur mère brunâtre contient des produits de condensation de l'acide glutamique que l'on peut séparer par un couplage des méthodes électrophorétique (à pH 3,9) et chromatographique (dans le butanol/acide acétique/eau). Outre l'acide pyroglutamique, quatre (ou cinq) dérivés peuvent être révélés par la réaction de PAN et DUTCHER (4I) (voir plus loin). Toutes les tâches sont ninhydrine négative (Fig.I)

Le chauffage prolongé (24h. à 170°C de l'acide pyroglutamique purifié ne fait plus apparaître de substances donnant la réaction du biuret. L'acide pyroglutamique ne se condense donc pas avec lui-même.

(\*) - Les D,L- aminoacides synthétiques (lysine base, monochlorhydrate de lysine, phénylalanine, thréonine, méthionine, leucine et tryptophane) nous ont été fournis par l'Alimentation Équilibrée de Commeny. L'acide L-glutamique nous a été généreusement procuré par les Etablissements FOULD-SPRINGER (Maison-Alfort, Seine).

Les peptides obtenus au cours de la préparation se forment uniquement au cours de la deshydratation de l'acide glutamique.

## B) METHODES DE CONDENSATION

Deux méthodes peuvent être employées.

### 1<sup>o</sup>) - Procédé de FOX et HARADA :

Un mélange d'acide pyroglutamique et d'un ou plusieurs autres acides aminés est finement pulvérisé au mortier. Ce mélange est ensuite introduit dans un tube à essai que l'on plonge dans un bain d'huile maintenu à température constante et comprise entre 165° et 190°C. Très rapidement l'acide pyroglutamique fond et les autres acides aminés entrent en réaction (\*). Au bout d'un certain temps de chauffage, on obtient à chaud un produit sirupeux qui, par refroidissement, donne une résine friable, hygroscopique et de coloration généralement ambrée.

Pour des rapports  $\frac{\text{acide aminé}}{\text{acide pyroglutamique}}$  faibles (inférieurs à 2 ou 3 mais variables avec les acides aminés) et après un temps de chauffage plus ou moins long, on obtient une masse visqueuse et homogène. Certains acides aminés se décomposent très rapidement au cours du chauffage et donnent naissance à des goudrons, c'est le cas de la cystine, de la cystéine, de la méthionine, de la sérine et de la thréonine ; d'autres amino-acides au contraire ne semblent pas se décomposer, même au cours d'un chauffage prolongé à 170°C : c'est le cas de l'acide aspartique, de la tyrosine, de la leucine et du monochlorhydrate de lysine.

### 2<sup>o</sup>) - Technique personnelle : (Condensation au départ d'une solution aqueuse).

Afin d'homogénéiser le plus possible le mélange initial, nous avons essayé de polycondenser l'acide pyroglutamique avec les autres acides aminés, après les avoir préala-

(\*) La réaction est accompagnée d'un lent dégagement de vapeur d'eau à réaction basique.

blement dissous dans le minimum d'eau bouillante. L'eau est ensuite évaporée lentement par chauffage à 105°-110°C et le mélange est porté à la température de condensation.

Avec des rapports  $\frac{\text{acide aminé}}{\text{acide pyroglutamique}}$  inférieurs à 2 ou 3 pour les acides aminés très solubles dans l'eau (glycocolle, thréonine, lysine, etc...) , on n'observe pas de recristallisation. Pour les acides aminés peu solubles dans l'eau (acide aspartique, tyrosine, leucine, etc.) cette technique ne présente pas d'avantage quant à l'homogénéité du milieu réactionnel ; l'addition d'acide chlorhydrique qui facilite la solubilisation n'est pas favorable car la réaction de condensation se fait avec des rendements très faibles.

Pour des températures supérieures à 160°C, les deux méthodes de condensation présentent les mêmes avantages et donnent des rendements identiques.

Par contre, la deuxième méthode permet d'obtenir des produits de polycondensation à des températures inférieures à 160°C (point de fusion de l'acide pyroglutamique). Nous avons ainsi révélé la présence de peptides, par chauffage prolongé (24 heures) à 130°C de la masse obtenue à partir de solutions aqueuses contenant de l'acide pyroglutamique et l'un des aminoacides suivants : glycocolle, méthionine, tryptophanne, thréonine. Cette variante de technique permet donc d'envisager la condensation des acides aminés qui sont peu stables à la chaleur et qui se décomposent très rapidement à des températures supérieures à 160°C. Mais cet abaissement de la température de condensation de 20 à 30°C au dessous du point de fusion de l'acide pyroglutamique doit être compensée par une augmentation importante du temps de chauffage afin d'obtenir des rendements valables. Après un chauffage à 130°C d'un mélange d'acide pyroglutamique et de glycocolle ( $\frac{\text{glycocolle}}{\text{pyroglutamique}} = 3$ ) un rendement pondéral de 18,2 % en polypeptides insolubles est obtenu au bout de 24 heures de réaction.

C) TECHNIQUES ANALYTIQUES

1<sup>o</sup>) Méthode de séparation des acides aminés et des peptides

a) Chromatographie sur papier Whatman 1 ou Whatman 3 avec les systèmes classiques n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) et phénol/eau

b) Electrophorèse sur papier dans des cuves en toit du type Durrum.

-Electrophorèse sur papier ) pH 3,9 dans le tampon acide acétique/pyridine/eau (100 : 30 : 4370) décrit par BISERTE et al (10), qui permet la séparation des acides aminés en plusieurs groupes (acide aspartique, acide glutamique, acides aminés "neutres" et les acides aminés "basiques". (Fig. 3).

-Electrophorèse à pH 2,4 dans l'acide acétique N qui permet la séparation des acides aminés neutres. (Fig. 5).

-Electrophorèse à pH 11 dans l'ammoniaque N qui permet la séparation des acides aminés basiques. (Fig.6).

Le couplage bidimensionnel de l'électrophorèse et de la chromatographie dans le système n-butanol/acide acétique/eau est également fréquemment utilisé. (Fig. 4 et 5).

c) Récupération des peptides après chromatographie ou électrophorèse sur papier : après séparation d'un mélange de peptides, et révélation de témoins latéraux (fig.7), les bandelettes de papier contenant les peptides sont éluées par l'eau dans l'appareil d'éluion automatique proposé par BISERTE (7) ou par un dispositif simplifié (fig.8). La solution de peptides récupérés est évaporée sous vide.

2<sup>o</sup>) Méthodes de révélations spécifiques

a) Acides aminés et peptides : Leur révélation sur papier se fait par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à Ip. 1000 dans le n-butanol, suivie d'un chauffage dans une étuve à 100°C pendant 5 à 10 minutes.

b) Peptides : La révélation des liaisons peptidique et

amide se fait par la réaction de RYDON et SMITH (42) modifiée par PAN et DUTCHER (41). Par pulvérisation d'une solution diluée d'hypochlorite (2° chlorométrique) on transforme les amides en chloramides. Après élimination de l'excès d'hypochlorite par ventilation ou pulvérisation d'éthanol, on pulvérise une solution à Ip. 100 d'iodure de potassium et d'amidon soluble; le chlore de la chloramide déplace l'iode qui colore l'amidon.

c) Tyrosine : La révélation spécifique de la tyrosine et des peptides à tyrosine se fait par l' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphtol : pulvérisation d'une solution alcoolique à Ip. 100 d' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphtol, séchage à l'étuve à 100°C puis pulvérisation d'une solution aqueuse à Ip. 100 d'acide nitrique et séchage à l'étuve à 100°C pendant 5 minutes. La tyrosine se révèle en rose rouge sur fond vert.

d) Arginine : Révélation spécifique par la réaction de SAKAGUCHI, par pulvérisation d'une solution acétonique à Ip. 1000 de 8-hydroxy-quinoléine puis d'une solution d'hypobromite. L'arginine se révèle en rouge.

e) Dicétopipérazine : les dicétopipérazines en solution sont mises en évidence par la réaction de SASAKI (46). Après 2 minutes d'ébullition en présence de picrate de sodium, les solutions contenant des dicétopipérazines se colorent en brun.

### 3°) Dosages

#### a) Techniques classiques

##### 1°) Hydrolyse des peptides

L'hydrolyse totale des peptides est effectuée dans l'acide chlorhydrique 5,6 N en tube scellé pendant 24 heures à 100°C.

2°) Dosage chromatographique : Après séparation chromatographique ou électrophorétique, les feuilles de papier sont révélées par la ninhydrine à Ip. 100 dans l'acétone tamponnée à pH. 7. Les taches violettes sont éluées dans un mélange d'acétone et d'eau (60 : 40) (v/v) et la mesure spectrophotométrique est pratiquée à 570 m $\mu$ . Des courbes témoins sont construites

pour chaque acide aminé particulier. (technique de BISERTE et al) (10)

3<sup>o</sup>) Dosage par la méthode des dinitrophénylaminoacides (méthode de Lévy) (37) L'hydrolysate est traité à pH 9 par le 2,4 dinitro-1-fluorobenzène. La dinitrophénylation est effectuée à pH constant et à 37°C (fig.9). La courbe de consommation de soude diluée qui est construite automatiquement permet de saisir facilement la fin de la réaction de condensation. (fig. 10). Les DNP-aminoacides sont fractionnés en deux groupes dont le plus important, le groupe des éthersolubles est séparé en chromatographie bidimensionnelle suivant la méthode de BISERTE et al. (9). Les DNP-aminoacides sont dosés spectrophotométriquement à 360 m $\mu$  après élution des taches par une solution de bicarbonate à 1p. 100. Le dispositif chromatographique de la première dimension (chromatographie ascendante) est schématisé sur la figure II et la carte chromatographique des DNP-acides aminés éthersolubles sur la figure I2.

4<sup>o</sup>) Dosage des peptides : les peptides ont été dosés par la réaction du biuret. Cette réaction a été effectuée en dissolvant un échantillon de peptide dans 2 ml de NaOH N ; après dilution avec 4 ml d'eau, on ajoute 0,8 ml de CuSO<sub>4</sub> à 2p. 100 (p/v). Au bout de 30 minutes on centrifuge et on lit la densité optique à 550 m $\mu$  contre un blanc. Nous avons vérifié que, dans les zones de concentration utilisée, les conditions d'application de la loi de BEER-LAMBERT étaient remplies.

#### b) Techniques particulières

1<sup>o</sup>) Dosage du glycolle : le dosage du glycolle sur des quantités de l'ordre de 10<sup>-3</sup> mole a été effectué par titrage potentiométrique en milieu non aqueux (acide acétique, acide formique) VIGNERON(54). Le mélange à doser est dissout dans 1 ml d'acide formique et dilué avec 40 ml d'acide acétique. Le dosage est fait avec une solution d'acide perchlorique 0,1 N dans l'acide acétique sur un potentiomètre muni d'une électrode de verre et d'une électrode au calomel (Fig. 2).

2°) Dosage de l'acide pyroglutamique : L'acide pyroglutamique est dosé après séparation chromatographique ou électrophorétique après hydrolyse. La méthode utilisée peut être schématisée de la façon suivante :

- séparation : après la réaction de condensation, le mélange de peptides contenant de l'acide pyroglutamique est dissout dans un certain volume d'eau ; une partie aliquote de cette solution est déposée sur du papier Whatman en vue d'une séparation par électrophorèse à pH 3,9 ou par chromatographie dans le butanol acide acétique.

- hydrolyse : après la séparation, les produits à doser sont repérés, grâce à des témoins latéraux et les bandes correspondantes sont découpées et éluées par l'eau. Les solutions sont évaporées et les résidus repris dans 0,2 ml de NaOH 6N sont portés à 80°C pendant 150 minutes. Le type d'hydrolyse choisi est recommandé pour l'acide pyroglutamique.

-Dosage : la solution hydrolysée est neutralisée par l'acide acétique et diluée avec de l'eau afin d'obtenir des solutions sensiblement  $0,5 \cdot 10^{-3}$  molaires en amino-acides. Celles-ci sont ensuite dosées en série à l'aide d'un analyseur automatique qui enregistre les densités optiques de la coloration donnée avec la ninhydrine (\*). La détermination quantitative est faite avec des solutions témoins d'acide pyroglutamique qui ont été soumises aux mêmes traitements. Le dosage à l'aide d'un analyseur automatique peut également être utilisé pour les autres amino-acides (glycocolle par exemple). Dans ces cas, il suffit d'utiliser des solutions témoins de l'acide aminé correspondant. Le dosage de quelques oligopeptides possédant l'acide pyroglutamique en position N-terminale peut également être réalisé par ce procédé après hydrolyse alcaline.

(\*) Le dispositif utilisé est un équipement "Technicon" adapté au dosage des acides aminés. L'adaptation a été réalisée au Laboratoire de Chimie Biologique par les soins du Professeur Agrégé DAUTREVAUX.

## CHAPITRE II

### INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LA CONDENSATION DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE ET DES AMINO-ACIDES

Au cours de cette étude, nous étudierons successivement l'influence de la température, du temps de chauffage et du rapport initial  $\frac{\text{acide aminé}}{\text{acide pyroglutamique}}$ .

#### A) Influence de la température. Energie d'activation de la réaction

Une augmentation de la température de condensation accélère notablement la vitesse de la réaction : l'étude de la variation de l'intensité de la réaction du biuret en fonction du temps illustre bien cette action sur la vitesse de réaction (Fig. I3).

La loi d'ARRHENIUS a été vérifiée en portant graphiquement le logarithme des vitesses initiales (pentes au temps  $t=0$ ) en fonction de  $\frac{1}{T}$  (fig. I4). La droite ainsi obtenue prouve que la constante de vitesse de la réaction obéit à la loi d'ARRHENIUS :

La mesure de la pente de cette droite donne l'énergie d'activation E.

$$\text{Pente} \# 5,1 \# \frac{E}{2,3 R} = \frac{E}{4,57}$$

$$\underline{\underline{E \# 23,4 \text{ Kcal/mole}}}$$

L'influence de la température se manifeste aussi sur les rendements en produits insolubles obtenus par condensation du glycocolle (fig. I5).

Cependant, l'utilisation de températures trop élevées n'est pas favorable, car elle facilite les réactions de décomposition des amino acides et conduit à l'obtention des produits dégradés (courbe pointillée de la figure I5).

Pour les amino-acides peu stables à la chaleur (comme la thréonine et la sérine) il est d'ailleurs préférable d'opérer à 140 °C et sous atmosphère inerte.

B) Influence de la durée de condensation

La durée de condensation a une très grande importance sur le rendement final en polypeptides. La figure I6 montre que le rendement en produits insolubles dans la condensation du glycolle, croit linéairement avec le temps (dans des limites de temps qui n'excèdent pas 4 heures).

De plus, les courbes représentant la variation du biuret en fonction du temps pour différents mélanges, montrent que la réaction atteint son degré d'avancement maximum, beaucoup plus rapidement pour un rapport  $\frac{\text{acide aminé}}{\text{acide pyroglutamique}}$  faible (fig. I7). Le prolongation de la durée de la réaction en vue d'obtenir des rendements maxima dépend donc du rapport initial  $\frac{\text{acide aminé}}{\text{acide pyroglutamique}}$ . La séparation des produits de condensation de la lysine (rapport  $\frac{\text{lysine}}{\text{acide pyroglutamique}} = 1$ ) illustre bien ce phénomène (fig. I8). Au bout de 48 heures de réaction, il reste beaucoup de lysine qui n'a pas réagi, et le couple de peptides A et B (dipeptides) apparu tout au début de la réaction est toujours en quantité équivalente.

Pour certains amino-acides, le temps de condensation ne peut être prolongé trop longtemps, car on arrive à des produits dégradés. (courbe pointillée de la figure I6).

Nous avons également vérifié que la quantité de dicétopipérazine formée au cours de la réaction augmentait avec la durée de chauffage.

C) Influence du rapport initial  $\frac{\text{acide aminé}}{\text{acide pyroglutamique}}$  (=rapport  $\frac{B}{A}$ )\*

Toute cette étude a été faite avec des mélanges d'acide pyroglutamique et de glycolle dans des rapports molaires  $\frac{\text{glycolle}}{\text{acide pyroglutamique}}$  (B/A)\* variables, chauffés à 168-170°C et préalablement pulvérisés au mortier.

I<sup>o</sup>) Evaluation quantitative des produits de condensation apparus au bout de deux temps de chauffage.

Des mélanges d'acide pyroglutamique et de glycolle

\* Pour simplifier la présentation de l'exposé nous adapterons la nomenclature suivante pour désigner le rapport  $\frac{\text{acide aminé}}{\text{acide pyroglutamique}}$   $\frac{B}{A}$

dans des rapports  $\frac{B}{A}$  variant de 0,5 à 8 ont été chauffés pendant deux temps différents : 75 et 150 minutes. Sur chacun des produits de condensation, l'évaluation quantitative des polypeptides a été mesurée par la méthode du biuret et par les rendements en produits adialysables.

L'étude de la variation de l'intensité de la réaction du biuret en fonction des rapports  $\frac{B}{A}$ , donnée par les produits de condensation obtenus au bout de 75 minutes (figure I9) montre un maximum pour le rapport  $\frac{B}{A} = 3$ . L'allure de cette courbe s'explique par le fait que le temps au bout duquel le degré d'avancement de la réaction est maximum, dépend du rapport initial  $B/A$  (fig. I7). C'est ainsi qu'au bout de 75 minutes, la réaction est terminée pour le mélange  $\frac{B}{A} = 1$ , tandis qu'elle se continue encore pour les mélanges  $\frac{B}{A} = 3$ .

La même explication est valable pour l'interprétation des courbes donnant le rendement pondéral en produits adialysables en fonction du rapport  $\frac{B}{A}$  (fig. 2I).

Les courbes des figures I9 et 2I montrent que le rapport  $\frac{B}{A}$  a une très grande importance sur les rendements en polypeptides, mais elles ne font pas ressortir le rôle de l'acide pyroglutamique, car tous les résultats sont donnés en fonction du rapport  $\frac{B}{A}$ .

A partir des courbes des figures I9 et 2I, on peut construire d'autres courbes dans lesquelles les résultats sont donnés en fonction de la quantité de glycolle contenue au départ dans des mélanges ayant la même quantité d'acide pyroglutamique (fig.20) (fig.22).

Cette deuxième interprétation des résultats montre que ce rendement en polypeptides, pour un temps de réaction donné dépend de la quantité de glycolle.

Or, l'acide pyroglutamique ne se condense pas sur lui même. Le glycolle possédant deux fonctions susceptibles de réagir l'une avec l'autre, ne se condense pas quand il est

chauffé seul dans les mêmes conditions, mais il se condense en présence d'acide pyroglutamique et les rendements en polypeptides est d'autant plus grand qu'il y a moins d'acide pyroglutamique. Ce phénomène ne peut s'expliquer que si l'acide pyroglutamique joue un rôle d'initiateur dans cette réaction.

2-) Influence du facteur temps sur l'état d'avancement de la réaction pour différents rapports  $\frac{B}{A}$ .

Les courbes exprimant les variations de l'intensité du biuret en fonction du temps pour différents mélanges  $\frac{B}{A}$  (fig.17) présentent rapidement un palier pour des rapports  $\frac{B}{A}$  faibles, tandis qu'elles continuent à croître pour des rapports  $\frac{B}{A}$  plus grands.

Le calcul des rendements en produits adialysables en fonction du rapport  $\frac{B}{A}$ , pour deux temps de chauffage différents (75 minutes et 150<sup>A</sup> minutes) (fig. 22) montre à la fois l'influence du rapport  $\frac{B}{A}$  pour un temps de chauffage donné et l'influence de la durée<sup>A</sup> de condensation pour un rapport  $\frac{B}{A}$  donné.

Ces résultats mettent bien en évidence le fait que plus le rapport  $\frac{B}{A}$  est grand, plus le temps de condensation doit être prolongé pour que le degré d'avancement de la réaction soit maximum.

3<sup>e</sup>) Composition en amino-acides des produits de condensation insolubles.

Les fractions insolubles obtenues après 75 ou 150 minutes de chauffage à 165°C (rapport  $\frac{B}{A}$  variant de 0,5 à 8) ont été soumises à l'hydrolyse acide. Après dinitrophénylation des hydrolysats, les DNP-amino acides (acides DNP-glutamique et DNP-glycocolle) ont été séparés en chromatographie unidimensionnelle et dosés par spectrophotométrie.

Les résultats de l'étude de la composition en

amino-acides de ces fractions sont aussi en faveur du rôle d'initiateur de l'acide pyroglutamique (tableau A)

TABLEAU A

Rapport <u>Glycocolle</u> ac. pyroglutamique du mélange initial	Rapports molaires <u>glycocolle</u> ac. glutamique de l'insoluble (75 minutes de réaction).	Rapports molaires <u>glycocolle</u> ac. glutamique de l'insoluble (150 minutes de réaction).
1,5	7,3	non dosé
2	9	8,9
3	II	9,3
4	9,5	10
5	10,6	9,3
6	9	9,7
8	9	12

Composition en aminoacides des fractions insolubles obtenues après 75 ou 150 minutes de chauffage par condensation à 168-170°C de l'acide pyroglutamique et du glycocolle en proportions variables.

### CHAPITRE III

#### STRUCTURE DES PRODUITS DE CONDENSATION

La structure et la composition des produits de condensation ont été étudiés soigneusement afin de pouvoir confirmer les structures peptidiques des produits formés et proposer éventuellement un processus de polycondensation.

#### A)- STRUCTURE ET COMPOSITION DES PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE

Après condensation d'un mélange d'acide pyroglutamique et de glycocolle, on peut séparer une fraction soluble dans l'eau et une fraction insoluble que l'on soumet à une dialyse contre de l'eau distillée afin d'éliminer les petites molécules. Les fractions solubles et dialysables sont ensuite mélangées.

##### I<sup>o</sup>)- Etude de la fraction soluble

##### a) séparation des produits de condensation

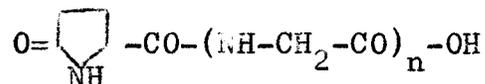
Les constituants de la fraction soluble sont très facilement séparés par un couplage bidimensionnel électrophorèse à pH 3,9 et chromatographie dans le système butanol/acide acétique (fig.23). La ninhydrine ne révèle que les taches B (glycocolie) et C (Glycyl-Glycine). Les autres produits sont révélés par la réaction de PAN et DUTCHER (4I). Les taches A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, et A<sub>7</sub> font partie d'une série homologue de peptides dont les comportements électrophorétiques et chromatographiques sont graduellement différents. La tache E correspond à la dicétopipérazine du glycocolle.

##### b) Composition et structure chimique des produits

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, ... A<sub>7</sub>.

En dosant par la ninhydrine et la méthode des DNP-amino-acides les hydrolysats de ces fractions, nous avons démontré que chacun de ces produits de condensation possède une molécule d'acide glutamique pour plusieurs de glycocolle. Le nombre de

molécules de glyco-colle augmente en fonction inverse de  $R_F$  des dérivés. Or, tous ces produits qui ont un comportement acide en électrophorèse donnent la réaction du biuret, mais ne se révèlent pas par la ninhydrine ; il faut donc considérer qu'ils ne possèdent pas de groupes  $\alpha$ -aminé terminal libre par suite de la formation d'un cycle pyroglutamique. La structure générale de ces produits est donc la suivante :

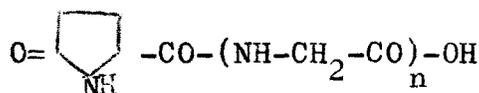


L'existence de peptides de ce type est reconnue ; en effet, deux peptides naturels possédant l'acide pyroglutamique en début de chaîne ont été isolés ; il s'agit du pyroglutamyl-glutaminy-glutamine (DEKAER)(13) et de l'eisénine ou pyroglutamyl-glutaminy-alanine (OHIRA)(40).

Pour vérifier cette structure, nous avons entrepris la synthèse du dipeptide pyroglutamyl-glycine ( $O=\text{C} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{NH} \\ \diagdown \end{array} -\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) qui possède les mêmes comportements électrophorétiques et chromatographiques que le peptide  $A_1$  (fig. 28 et 29)

De plus, le dipeptide glycyl-glycine (diglycine) et le tripeptide diglycyglycine (ou triglycine) ont été chauffés avec de l'acide pyroglutamique. La séparation des produits de condensation par le même couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 3,9 et chromatographie dans le butanol/acide acétique) révèle également la présence des peptides  $A_2$ ,  $A_4$  et  $A_6$  pour la diglycine (fig. 24) et des peptides  $A_3$  et  $A_6$  pour la triglycine (fig. 25). De la même manière le peptide pyroglutamyl-glycine de synthèse ( $A_1$ ) a été chauffé lui aussi avec de la "diglycine" et de la "triglycine" et la séparation des produits de condensation révèle la présence des peptides  $A_3$  et  $A_5$  pour la diglycine (fig. 26) et  $A_4$  pour la triglycine (fig. 27).

Tous ces résultats sont donc en faveur de l'existence d'une série homologue de peptides répondant à la structure générale.



### Synthèse du peptide. pyroglutamyl-Glycine

Cette synthèse a été faite à partir de l'acide pyroglutamique et du glycolle par la méthode à la N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide (SHEEHAN et coll.)(47)(48), que nous avons adaptée à ce cas particulier. On dissout 0,02 mole d'acide pyroglutamique dans le minimum d'éthanol absolu et on y ajoute une solution éthérochloroformique de glycinate d'éthyle (0,02 mole). Après refroidissement à 5°C, on ajoute 0,022 mole de N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide. Au bout de 45 minutes un précipité de N,N' dicyclohexylurée commence à apparaître. On laisse sous agitation pendant 15 heures et on lave la phase organique par une solution d'HCl à 3,5 %, puis par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 3,5 %. Les fractions aqueuses sont mélangées, amenées à pH.6, évaporées à sec et reprises par l'acétone pour éliminer le chlorure de sodium. La solution acétonique additionnée d'un peu d'eau est mise à évaporer. Il se dispose de petits cristaux blancs de pyroglutamyl-glycinate d'éthyle (TF : 65-70°C). Celui-ci est saponifié en milieu acétonique par la quantité stœchiométrique de NaOH puis acidifié au bout d'une heure. On évapore à sec et on dissout le peptide dans le minimum d'éthanol bouillant. Par cristallisation on recueille le peptide (TF : 149°C) (rendement 52 %).

#### 2°)- Etude de la fraction insoluble

a) composition en amino-acides : la détermination du rapport  $\frac{\text{gly}}{\text{glu}}$  des fractions insolubles a été abordée après hydrolyse totale par la méthode des DNP-amino acides. Ce rapport est environ de 10 pour toutes les fractions insolubles quels que soient le temps de réaction et le rapport initial  $\frac{B}{A}$  (voir tableau A du chapitre II).

b) dosage des COOH terminaux : la détermination quantitative des groupements carboxyles libres a été faite en mesurant la quantité de NaOH que peut fixer cette fraction polypeptidique à pH. 7. Cette mesure a été réalisée à l'aide d'un titrateur automatique.

Pour salifier 50mg de polipeptide nous avons utilisé  $6,25 \cdot 10^{-5}$  mole de NaOH. Le poids moléculaire moyen de ce polypeptide est donc de :  $M = \frac{0,05}{6,25 \cdot 10^{-5}} = 800$

Si le polypeptide a pour formule  
pyroglutamyl  $-(\text{gly})_{n-1}-\text{gly}-\text{OH}$

n est donc égal à  $\frac{800 - 129}{75 - 18}$  soit 11,8

Nous retrouvons approximativement par cette méthode la composition en amino-acides donnée par le dosage (tableau A du chapitre II). Ces résultats sont en désaccord avec ceux de HARADA et FOX (27) qui trouvent un poids moléculaire plus important de l'ordre de 11.000 à 20.000. Dans leur article, la détermination de ce poids moléculaire a été réalisée par le dosage des acides aminés en position N-terminale. Etant donné que nous avons démontré que ces groupes aminés pouvaient être bloqués, il n'est pas étonnant que HARADA et FOX trouvent des valeurs trop fortes.

#### c) Détermination des acides aminés en position N-terminale

La leucine-amino peptidase préparée à partir du rein de porc par la méthode de SPACKMAN (49) modifiée par HILL et SMITH (31), n'a aucune action sur ces polypeptides, ce qui prouve que leur groupement  $\alpha$ -aminé terminal est bloqué (\*).

Cependant, la dinitrophénylation de ces polypeptides donne après hydrolyse totale des traces d'acide DNP-glutamique et de DNP-glycocolle.

#### d) Détermination des acides aminés en position C-terminale

La carboxypeptidase (\*\*\*) n'a aucune action sur ces polypeptides, mais c'est un fait d'observation classique que

(\*) La leucine-amino peptidase est en réalité une aminopeptidase du type des exopeptidases qui libère dans une chaîne peptidique les acides aminés porteurs d'un groupe  $\alpha$ -aminé libre.

(\*\*) La carboxypeptidase est une exopeptidase qui libère dans une chaîne peptidique les acides aminés porteurs d'un groupe  $\alpha$ -carboxylique libre. Son action peut être limitée par certains résidus d'acides aminés, la proline par exemple.

que la carboxypeptidase n'agit pas sur les peptides à glyco-colle (STAHMANN) (50).

e) Etude de l'hydrolysate partiel acide

L'hydrolyse partielle acide des polypeptides permet, grâce à des coupures faites au hasard, de déterminer certaines séquences d'acides-amino. L'hydrolyse partielle a été faite dans l'acide chlorhydrique pur à 37°C. Au bout de 4 à 5 jours, l'hydrolyse est pratiquement complète. (Fig. 30). L'étude de quelques séquences a été réalisée sur l'hydrolysate de 24 heures.

Après hydrolyse, la solution est évaporée rapidement sous vide pour éliminer l'acide chlorhydrique. Les peptides sont séparés par le couplage bidimensionnel électrophorèse à pH 3,9-chromatographie Butanol/acide acétique (fig. 31). Après révélation le chromatogramme présente 7 taches importantes et différentes. Chacune d'elle a été l'objet d'une étude structurale.

1°) Identification des acides aminés libres :

D'après leur comportement électrophorétique et chromatographique, l'acide glutamique a été identifié comme étant la tache G<sub>3</sub> et le glyco-colle comme étant la tache G<sub>6</sub> (Fig. 31).

Les autres taches correspondent à des peptides qui ont été récupérés après électrophorèse puis purifiés par chromatographie. Chacun de ces peptides a été l'objet d'une étude structurale précise.

2°) Structure du peptide G<sub>4</sub>

Composition en acides-amino

- Hydrolyse totale acide suivie d'un dosage par la ninhydrine après séparation en électrophorèse (pH 3,9).

- Valeur expérimentale  $\frac{\text{glu}}{\text{gly}} = 1,1$  . Il s'agit donc d'un dipeptide.

Détermination de l'acide aminé en position

N-terminale

- après dinitro-phénylation par le DNFB dans un tampon de pH 9,3 (4 heures à t° ambiante), l'excès de DNFB est enlevé par

extraction en milieu acide par l'éther.

- le DNP-peptide est extrait par le butanol secondaire et hydrolysé 24 heures par HCl 5,6 N en tube scellé (105°C).

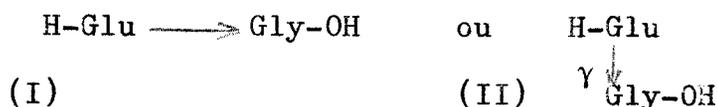
- le DNP-aminoacide est extrait par l'éther et identifié par chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes "toluène" et phosphate : il s'agit de l'acide DNP-glutamique (fig. 33).

Dans la phase aqueuse de l'hydrolysate du DNP-peptide, on identifie le glyocolle. (fig. 37).

### Structure

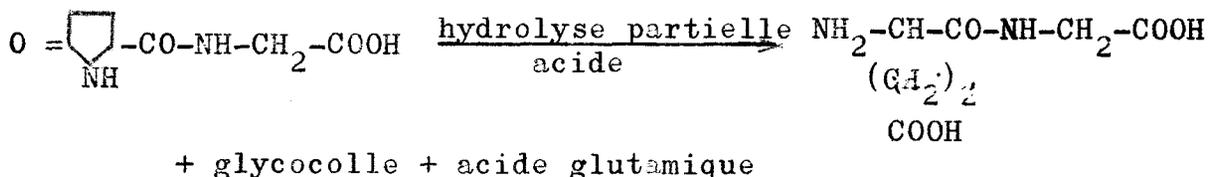
(Pour les abréviations et les règles de nomenclature, voir les indications données par l'IUPAC)

en tenant compte des résultats expérimentaux décrits, deux structures sont possibles :



La structure (I) a été retenue comme étant celle du peptide G<sub>4</sub> car il a les mêmes propriétés que le peptide obtenu par hydrolyse partielle du pyroglutamyl-glycine de synthèse.

En effet, l'acide pyroglutamyl-glycine de synthèse, soumis aux mêmes conditions d'hydrolyse (24h. ) 37°C dans HCl pur ) donne, en plus du glyocolle et de l'acide glutamique libérés, un peptide qui a le même comportement électrophorétique et chromatographique que le peptide G<sub>4</sub> et qui ne peut être que le produit d'hydrolyse du cycle pyroglutamique.



En conclusion le peptide G<sub>4</sub> correspond au dipeptide de structure H-Glu → Gly - OH

3<sup>e</sup>) - Structure du peptide G1

composition en amino acides

- hydrolyse totale acide (HCl 5,6 N) en tube scellé à 105°C (24H.)
- Dosage de l'acide glutamique et du glycolle par la ninhydrine après séparation électrophorétique à pH 3,9.
- Valeur expérimentale  $\frac{\text{Gly}}{\text{Glu}} = 2,2$

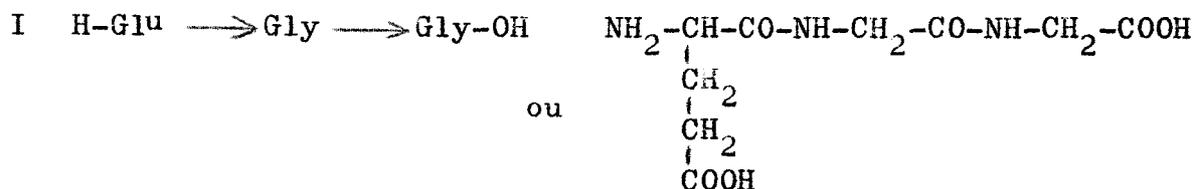
Détermination de l'acide aminé porteur du groupement aminé terminal libre

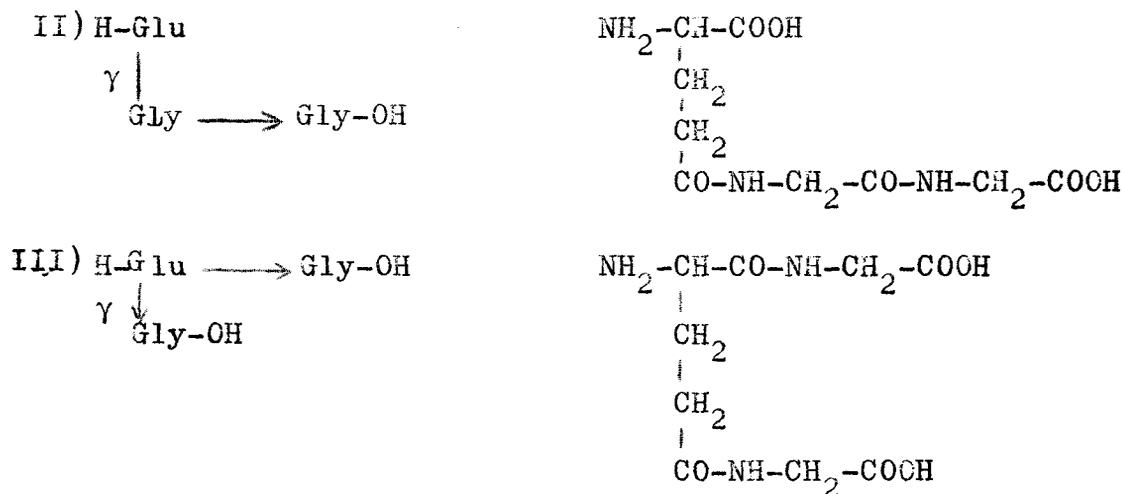
- Dinitrophénylation du peptide dans un tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,3 par le 2-4 dinitrofluorobenzène (DNFB)
- après réaction (4 heures à température ambiante), l'excès de DNFB est enlevé par extraction à l'éther en milieu alcalin.
- Le dinitrophénol (DNP-OH) est éliminé par extraction à l'éther en milieu acide.
- Le dinitrophénylpeptide (DNP-peptide) est extrait par le butanol secondaire.
- Détermination du DNP-aminoacide constitutif du DNP-peptide.
  - Hydrolyse totale acide (HCl 5,6 N) en tube scellé ) 105°C (24 heures)
  - extraction du DNP-amino-acide par l'éther
  - Identification du DNP-aminoacide : par chromatographie bidimensionnelle ("Toluène"-phosphate), on identifie l'acide DNP-glutamique (fig. 34).

Détermination des amino-acides non dinitrophénylés

- la phase aqueuse qui contient les acides aminés du peptide, non porteur d'un groupement aminé libre, est évaporée et mise en électrophorèse à pH 3,9. On identifie le glycolle (fig. 37).

structure du peptide : c'est un tripeptide formé d'une molécule d'acide glutamique et de deux de glycolle, l'acide glutamique se trouvant en position N-terminale. Des résultats expérimentaux décrits, on peut déduire trois formules différentes :





Il est difficile de se faire une opinion sur la structure la plus vraisemblable. Ces trois types peuvent en effet exister. Toutefois, l'existence d'un enchaînement de type  $\gamma$  (formules II et III) prouverait l'ouverture du cycle pyroglutamique au cours de la condensation.

#### 4<sup>o</sup>) Structure du peptide G<sub>7</sub>

##### composition en amino acides

après hydrolyse totale acide, on met en évidence que du glycocolle

##### structure

La fraction G<sub>7</sub> mise en électrophorèse à pH 2,4 avec des témoins latéraux de peptides de glycocolle (diglycine et triglycine) montre la présence dans cette fraction d'un mélange de peptides de glycocolle : diglycine, triglycine et vraisemblablement tétraglycine (Fig. 38) Ces digopeptides ne sont pas séparables en électrophorèse à pH 3,9.

#### 5<sup>o</sup>) structure des peptides G<sub>2</sub> et G<sub>5</sub>

leur structure n'a pu être déterminée avec précision. Il faut tout d'abord signaler que les taches G<sub>2</sub> et G<sub>5</sub> sont en fait hétérogènes en chromatographie dans le butanol/acide acétique. D'autre part, ils existent en petite quantité dans le produit brut de condensation. Leur isolement est donc relativement difficile. Toutefois, après dinitrophénylation, on peut isoler de l'hydrolysât et identifier de l'acide DNP-glutamique.

La phase aqueuse de l'hydrolysât contient encore de

l'acide glutamique (fig. 37).

Il est utile de rappeler que le DNP-glycocolle est très sensible à l'hydrolyse en milieu chlorhydrique 5,6 N à 105°C. Il n'est donc pas impossible de penser que le DNP-glycocolle éventuellement présent soit de ce fait complètement détruit. Nous reviendrons sur ce problème ultérieurement à propos de la structure des peptides à alanine.

La seule conclusion que nous pouvons tirer de ces résultats est que l'acide glutamique peut être placé en position intrapeptidique dans les produits de condensation :

...X-X-Glu-X-X...

CONCLUSION sur LES PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE :

Les séquences suivantes peuvent être discutées :

- H-Glu  $\longrightarrow$  Gly-OH provenant de Pyro  $\longrightarrow$  Gly-OH
  - Diglycine, triglycine, tétraglycine
  - H-Glu  $\longrightarrow$  Gly  $\longrightarrow$  Gly-OH ou H-Glu  $\xrightarrow{\gamma}$  Gly  $\longrightarrow$  Gly-OH
- ou
- H-Glu  $\longrightarrow$  Gly-OH  
 $\quad \quad \quad \gamma \downarrow$   
 $\quad \quad \quad$  Gly-OH

- L'acide glutamique peut se trouver en position intrapeptidique :  
 ...X-X-Glu-X-X...

B)- ETUDE DES PRODUITS DE CONDENSATION DE L'ALANINE

De l'alanine a été chauffée avec de l'acide pyroglutamique (rapport  $\frac{B}{A} = 5$ ) pendant 230 minutes à 170°C sous atmosphère de CO<sub>2</sub>.

Le couplage (électrophorèse à pH 3,9 et chromatographie dans le butanol/acide acétique) sépare, comme dans le cas du glycocolle une série de peptides acides non révélables par la ninhydrine mais décelables par la réaction de PAN et DUTCHER, de l'alanine libre, une certaine quantité du peptide alanyl-alanine et la dicétopipérazine de l'alanine.

1°) amino acides en position C-terminale

La détermination des acides aminés en position C-terminale a été faite par la carboxypeptidase. Le produit brut de la réaction, entièrement soluble dans l'eau, a été

purifié de l'alanine libre en excès par passage sur une résine type polystyrène sulfonée (Amberlite IR 120, forme hydrogène). La fraction non retenue contient de l'acide pyroglutamique et tous les peptides acides. Elle a été soumise à l'hydrolyse par la carboxypeptidase à pH 8,5 et à 37°C (concentration enzyme/ substrat : 1/50). Au bout de 15 heures de réaction à 37°C, la chromatographie des produits d'hydrolyse révèle la présence d'alanine libre. Par contre, il n'y a aucune trace d'acide glutamique libéré.

## 2°) Etude de l'hydrolysats partiel acide.

La fraction peptidique purifiée (voir plus haut) a été soumise à l'hydrolyse partielle acide dans les mêmes conditions que les peptides à glycocolle. Après élimination de l'acide chlorhydrique, on sépare par le couplage bidimensionnel (électrophorèse à pH 3,9 et chromatographie dans le butanol/acide acétique) à peu près autant de peptides que dans l'hydrolysats partiel du "polyglycocolle". Ces peptides ont des comportements très comparables aux peptides obtenus à partir du polyglycocolle. (Fig. 32).

Les acides aminés libérés par hydrolyse ont été identifiés comme étant  $A_3$  (acide glutamique) et  $A_6$  (alanine).  $A_7$  a été identifié comme étant le dipeptide alanyl-alanine.

Par analogie avec l'hydrolysats partiel des peptides à glycocolle (fig. 31) le peptide  $A_1$  peut être comparé au peptide  $G_1$  et le peptide  $A_4$  au peptide  $G_4$ .

Ce qui a retenu principalement notre attention dans cet hydrolysats se sont les fractions  $A_2$  et  $A_5$ , analogues aux fractions  $G_2$  et  $G_5$  de l'hydrolysats partiel des peptides à glycocolle. En effet, lors de l'étude précédente concernant les peptides  $G_2$  et  $G_5$ , nous n'avions pas pu aboutir à des conclusions précises. Les fractions  $A_2$  et  $A_5$  ont été dinitro-phénylées et, après extraction du DNP-OH et élimination des DNP-amino acides éthérosolubles souillant chacune de ces fractions, les DNP peptides ont été extraits par le butanol secondaire, et hydrolysés totalement.

Après hydrolyse les DNP-aminoacides ont été extraits par l'éther. La chromatographie bidimensionnelle ("Toluène" et phosphate) de la phase étherée, sépare l'acide DNP-glutamique en grande quantité et la DNP-alanine (Fig. 35 et 36).

La DNP-alanine a été identifiée dans les deux fractions  $A_2$  et  $A_5$  : ce qui prouve qu'il existe dans ces fractions, des peptides ayant l'alanine en position N-terminale. La phase aqueuse de l'hydrolysats mise en électrophorèse à pH 3,9 contient aussi de l'acide glutamique libre.

Ces résultats nous permettent de conclure à l'existence d'un peptide du type Ala-Glu dans l'hydrolysats partiel et d'enchaînement du type-Ala-Glu-dans les produits de condensation. Mais les taches  $A_2$  et  $A_5$  sont hétérogènes et contiennent également des peptides où l'acide glutamique est en position N-terminale.

#### CONCLUSION SUR LES PRODUITS DE CONDENSATION DE L'ALANINE :

Les conclusions suivantes peuvent être tirées en ce qui concerne les séquences :

- présence d'alanyl-alanine
- séquence -Ala-Glu-
- la carboxypeptidase détache de l'alanine en position C-terminale à partir des produits bruts de condensation.
- l'existence du peptide Glu  $\rightarrow$  Ala n'est évidemment pas discutable (peptide  $A_4$  correspondant à  $G_4$ ).

C)- STRUCTURE DES PRODUITS DE CONDENSATION DU MONOCHLORHYDRATE DE LYSINE

Quelques peptides séparés du mélange complexe obtenu par chauffage de l'acide pyroglutamique et du monochlorhydrate de lysine (rapport  $\frac{B}{5} = 1$ ) ont été étudiés en détail.

La séparation électrochromatographique (fig. 39 et 40) du produit brut de condensation montre l'hétérogénéité des peptides formés. Outre quelques oligopeptides bien définis, il existe une grande zone contenant des peptides de structure complexe. Les acides aminés libres ont été identifiés comme étant  $B_1$  (acide glutamique) et  $C_0$  (lysine).

Les peptides ont été séparés d'abord en chromatographie dans le butanol/acide acétique en trois groupes (A, B et C) et chacune de ces fractions mise en électrophorèse (à pH 3,9) afin de séparer chaque constituant.

1<sup>o</sup>) Structure de  $A_1$

- Composition en amino acides : elle a été déterminée après hydrolyse totale (HCL 24Heures à 105°C) et électrophorèse à pH 3,9 (fig. 41) par dosage à la ninhydrine. Valeur expérimentale  $\frac{Glu}{Lys} = 1,96 - 2,02$

Il s'agit donc d'un tripeptide contenant deux molécules d'acide glutamique et une de lysine.

$A_1$  ne se révèle pas par la ninhydrine ; il ne possède donc pas de groupement aminé. Après hydrolyse, il possède deux molécules d'acide glutamique pour une molécule de lysine, et a un caractère acide. Sa structure ne peut être que la suivante :



2<sup>o</sup>) Structure de  $A_0$

L'hydrolyse totale de  $A_0$  (HCl 5,6 N - 24 heures à 105°C) ne donne que de la lysine. Cependant la structure de  $A_0$  n'a pu être déterminée par la méthode des DNP-amino acides, car le dérivé dinitrophénylé de  $A_0$ , qui est éthérosoluble, s'est retrouvé intact, après hydrolyse. Nous avons vérifié

qu'il ne s'agissait pas du produit de décarboxylation de la lysine (cadavérine).

### 3<sup>e</sup>) Structure de B<sub>2</sub>

#### a) composition en amino-acides

hydrolyse totale acide (HCl 5,6 N) en tube scellé à 105°C pendant 24 heures.

Dosage de l'acide glutamique et de la lysine par la ninhydrine après séparation électrophorétique à pH 3,9 (fig. 42)

Valeur expérimentale :  $\frac{\text{Lysine}}{\text{glutamique}} = 0,86 - 1,04$

B<sub>2</sub> est un dipeptide

#### b) Détermination de l'acide aminé porteur d'un groupement α-aminé terminal libre

Dinitrophénylation du peptide dans la triéthylamine à Ip.100 par la méthode de SANGER. (43)

Extraction du FDNB en milieu basique par l'éther

Extraction du DNP-OH en milieu acide par l'éther

Extraction du DNP-peptide en milieu acide par le butanol secondaire.

Hydrolyse totale du DNP-peptide B<sub>2</sub> (24 heures à 105°C en tube scellé par HCl 5,6 N)

Extraction par l'éther : pas de DNP-aminoacide éthersoluble

Extraction par le butanol secondaire : présence d'un DNP-amino acide dérivé de la lysine.

Identification du DNP-aminoacide

Le DNP-aminoacide ne peut être qu'un dérivé monodinitro-phénylé de la lysine, car l'acide DNP-glutamique et la di DNP-Lysine qui pourraient être éventuellement présents par suite de la composition du dipeptide, sont éthersolubles.

Le DNP-aminoacide est mis en électrophorèse à pH 11 (ammoniacque N) avec des témoins latéraux d'α-DNP-et d'ε-DNP-lysine : le produit isolé de l'hydrolysate possède le compor-

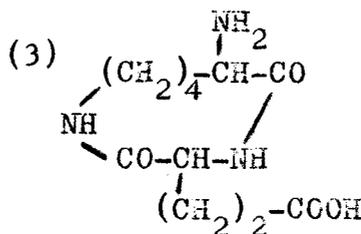
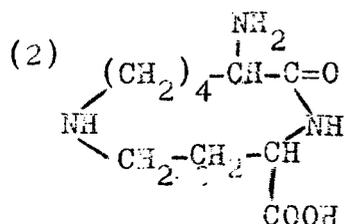
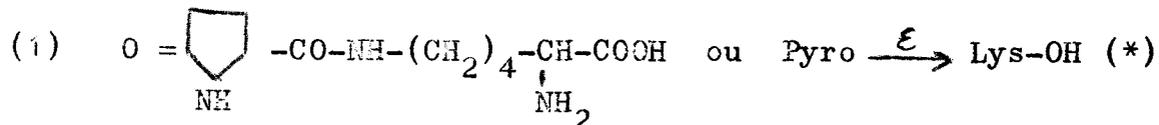
tement de l'  $\alpha$ -DNP lysine (fig. 46).

c) Détermination de l'acide aminé non dinitrophénylé.

Après extraction du DNP-aminoacide par le butanol secondaire, l'hydrolysat est concentré et mis en électrophorèse à pH 3,9. Seul l'acide glutamique est identifié (fig. 42)

d) Structure du peptide B<sub>2</sub>

En tenant compte des résultats rassemblés, trois structures sont possibles :



La structure la plus vraisemblable est la structure (1)  
 $\text{Pyro} \xrightarrow{\epsilon} \text{Lys-OH}$

4) Structure de B<sub>3</sub>

La détermination de la structure de B<sub>3</sub> a été menée de la même manière que celle de B<sub>2</sub> (fig. 43)

Le dosage a donné les résultats suivants : rapport

$$\frac{\text{lysine}}{\text{glutamique}} = 0,96 - 0,98$$

Il s'agit donc d'un dipeptide.

L'hydrolyse totale du DNP-peptide donne un DNP-aminoacide hydrosoluble, extrait par le butanol secondaire, et qui est identifié comme étant l'  $\epsilon$ -DNP lysine par une électrophorèse à

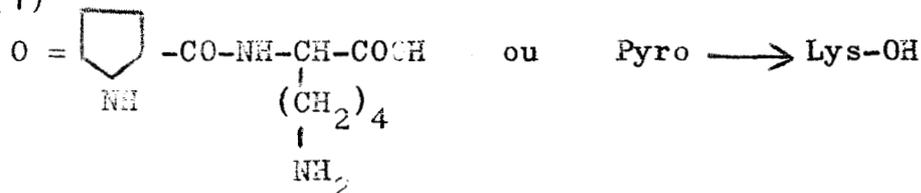
(\*) Les règles de nomenclature internationales n'ont pas été précisées dans le cas particulier où le groupe aminé impliqué dans la liaison peptidique n'était pas un groupe  $\alpha$ -aminé. Nous avons donc retenu cette abréviation analogue avec la règle formulée pour l'origine du groupement carboxylique impliqué dans une liaison peptidique. Dans ce cas particulier, ceci signifie que c'est le groupe  $\epsilon$ -aminé de la lysine qui est lié au groupement  $\alpha$ -carboxylique de l'acide pyroglutamique tandis que le groupe  $\alpha$ -aminé du résidu de lysine reste libre.

pH 11 (fig. 46).

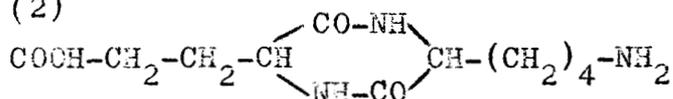
La phase aqueuse de l'hydrolysats a été mise en électrophorèse à pH 3,9. Seul l'acide glutamique a été identifié (fig. 43).

Structure de B<sub>3</sub> : En tenant compte des résultats réassemblés, trois structures sont possibles :

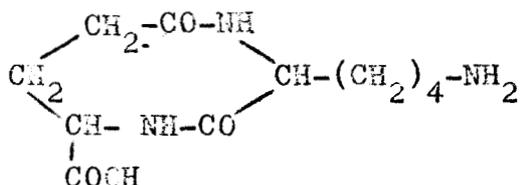
(1)



(2)



(3)



La structure la plus vraisemblable est la structure (I)

5°) - Structure de B<sub>4</sub>

Composition en aminoacides déterminée par la ninhydrine après hydrolyse totale : (fig. 44) rapport  $\frac{\text{lysine}}{\text{glutamique}} = 2$

Après dinitrophénylation, le DNP-peptide a été extrait par le butanol secondaire puis hydrolysé.

L'hydrolysats donne un DNP-amino acide hydrosoluble que l'on extrait par le butanol secondaire, et qui est identifié comme étant l'ε-DNP-lysine par électrophorèse à pH 11 (fig.46).

La phase aqueuse de l'hydrolysats ne contient que de l'acide glutamique, identifié par électrophorèse à pH 3,9 (fig. 44).

Comme pour le peptide B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub>, le composé B<sub>4</sub> ne contient pas d'extrémité α-aminé terminale libre. Comme pour le peptide B<sub>3</sub>, la lysine est engagée dans la liaison peptidique par son groupe α-aminé. Les comportements électrochromatographi

ques de B<sub>3</sub> et de B<sub>4</sub> sont différents : B<sub>4</sub> étant notamment plus "basique" que B<sub>3</sub>. Cette remarque s'explique par la composition du peptide (2 résidus de lysine au lieu d'un). La structure proposée est donc :

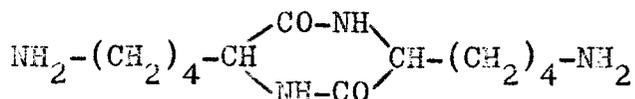


6<sup>e</sup>) Structure de C<sub>1</sub>

C<sub>1</sub> est un composé très "basique". Par hydrolyse totale, il ne donne que de la lysine. C'est donc un produit de condensation de la lysine. (fig.45)

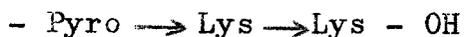
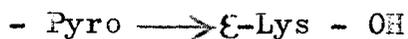
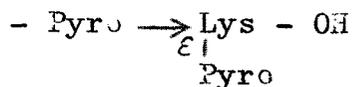
Après dinitrophénylation, le dérivé dinitrophénylé de C<sub>1</sub> extrait par le butanol secondaire est hydrolysé. L'hydrolysat ne contient pas de DNP-amino-acide éthérosoluble, mais un DNP-amino-acide hydrosoluble, extrait par le butanol secondaire et identifié comme étant l' ε -DNP-lysine.

La phase aqueuse ne contient aucun amino acide. Le composé C<sub>1</sub> est donc la dicétopipérazine de la lysine.



CONCLUSIONS SUR LES PRODUITS DE CONDENSATION DU MONOCHLORHYDRATE DE LYSINE

Les séquences suivantes ont été proposées :



- La dicétopipérazine de la lysine existe également dans les produits bruts de condensation.

D<sup>o</sup>- STRUCTURE DES PRODUITS DE CONDENSATION DE LA TYROSINE

Le l'acide pyroglutamique et de la tyrosine ont été chauffés 24 heures à 165°C (rapport  $\frac{B}{A} = 1$ ). Le produit brut de condensation a été mis en électrophorèse à pH 3,9 (fig. 47). La révélation à la ninhydrine permet de localiser la tyrosine, qui n'a pas réagi un peu d'acide glutamique et des traces de peptides. Au contraire, la révélation à l' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphтол (voir chapitre I, Techniques) révèle une série de peptides acides dont la structure peut correspondre à la formule générale suivante :  $\text{Pyro} - (\text{Tyr})_n - \text{OH}$

Le nombre(n) variant progressivement en fonction du comportement électrophorétique.

E)- STRUCTURE DES PRODUITS DE CONDENSATION DE LA PHENYLALANINE

Un mélange d'acide pyroglutamique et de phénylalanine (E/A = 5) a été chauffé 3 heures à 170°. La fraction soluble du milieu alcalin et insoluble en milieu acide dont la composition est  $\frac{\text{Phé}}{\text{Glu}} = 3,1$  a été soumise à l'hydrolyse par la carboxypeptidase, dans un tampon phosphate M/15 de pH 8,7 (rapport  $\frac{\text{enzyme}}{\text{substrat}} = \frac{1}{50}$ ). Au bout de 15 heures de réaction, les chromatogrammes révèlent la présence exclusive de phénylalanine.

En conclusion, la phénylalanine existe en position C-terminale. C'est d'ailleurs un fait d'observation classique que la carboxypeptidase détache facilement la phénylalanine en position C-terminale. Ces résultats sont évidemment en faveur de la structure générale  $\text{Pyro} - (\text{phé})_n - \text{OH}$

F)- STRUCTURE DES PRODUITS DE CONDENSATION de l'ACIDE ASPARTIQUE

1<sup>o</sup>) Condensation de l'acide aspartique avec l'acide pyroglutamique

Les produits de condensation de l'acide aspartique avec l'acide pyroglutamique sont d'un type particulier. Les produits de condensation, insolubles dans l'eau, sont solubles dans la



Ces trois acides aminés ont été chauffés pendant 24 heures à 165°C dans les proportions moléculaires suivantes : ac. pyroglutamique : 2 ; acide aspartique : 1 ; tyrosine : 1.

Le produit de condensation dissout dans la soude diluée a été séparé en électrophorèse à pH 3,9 (fig.48). La ninydrine ne révèle que l'acide glutamique et la tyrosine libres, mais la révélation à l'  $\alpha$ -nitroso  $\beta$ -naphтол permet de déceler de nombreux produits de condensation de la tyrosine.

Il est important de signaler que comparativement aux produits de condensation de l'acide pyroglutamique et de la tyrosine (fig. 47), ceux qui proviennent du mélange chauffé d'acide pyroglutamique, d'acide aspartique et de tyrosine sont nettement plus "acides".

#### TABLEAU B

Composition en amino-acides constitutifs des peptides de haut poids moléculaires obtenus par condensation de quelques mélanges d'acides aminés.

A : composition en amino-acides des mélanges initiaux

B : Composition en amino-acides des fractions étudiées.

Dans la première colonne du tableau, le premier nombre (en face de A) correspond au pourcentage d'acide pyroglutamique dans le mélange initial, le second (en face de B) au pourcentage d'acide glutamique dosé dans le polypeptide. Il est entendu que, dans le polypeptide, on peut trouver soit de l'acide pyroglutamique, soit de l'acide glutamique.



Ce caractère acide est dû à la présence de résidus d'acide aspartique dont certains groupes carboxyliques sont libres.

La composition en acides aminés de la fraction adialysable est nettement différente de la composition initiale (tableau B). Il y a augmentation du pourcentage en acide aspartique et baisse de celui en acide glutamique.

### 3°) Condensation de l'acide aspartique et du monochlorhydrate de lysine en présence d'acide pyroglutamique

La condensation a été réalisée pendant 24 heures à 165°C à partir d'un mélange dans les proportions molaires suivantes : acide pyroglutamique : 1 ; acide aspartique : 1 ; monochlorhydrate de lysine : 2.

Le produit brut de condensation a été dissout dans de la soude diluée afin d'hydrolyser les cycles imides, puis dialysé. La fraction adialysable a été hydrolysée par HCl 5,6 N (24h. à 105°C) afin de doser les acides aminés constitutifs. (tableau B). La prédominance de l'acide aspartique (35p. 100) et de la lysine (45p. 100) est très marquée. Les acides aminés en position N-terminale ont été déterminés par la méthode des dinitrophényl-aminoacides de SANGER (43): après étude chromatographique les trois acides aminés utilisés pour la réaction de polycondensation peuvent se trouver en position N-terminale.

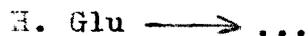
De plus, après hydrolyse totale de la fraction adialysable dinitrophénylée, on peut déceler par chromatographie de la lysine libre. Ces résultats permettent d'attribuer à certaines régions du polypeptide, une structure tridimensionnelle.

Enfin, les deux dérivés monodinitrophénylés de la lysine qui se trouvent dans la phase hydrosoluble de l'hydrolysate sont séparés sur une colonne de talc (SANGER) (44). Après électrophorèse sur papier à pH 11 (fig. 50), on peut réaliser la séparation de l'  $\alpha$  -mono-DNP-lysine et de l'  $\epsilon$  -mono-DNP-lysine. Les éluats des deux taches sont dosés afin d'établir la proportion de deux dérivés. La prédominance de l'  $\epsilon$  -DNP-lysine sur l'  $\alpha$  -DNP-lysine est faible (rapport  $\frac{\epsilon\text{-DNP-lysine}}{\alpha\text{-DNP-lysine}} = 2$ ). Ce résultat nous permet de conclure que la lysine se condense principalement par son groupement  $\alpha$ -aminé. Le poids

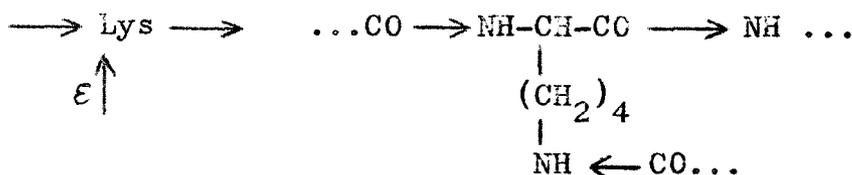
moléculaire moyen de la fraction adialysable mesuré par ultra-centrifugation a été trouvé voisin de 5.500 (voir chapitre V).

CONCLUSIONS DE L'ETUDE DES PRODUITS DE CONDENSATION de l'ACIDE PYROGLUTAMIQUE, de l'ACIDE ASPARTIQUE et du MONOCHLORHYDRATE de LYSINE

- Etude des extrémités N-terminales :



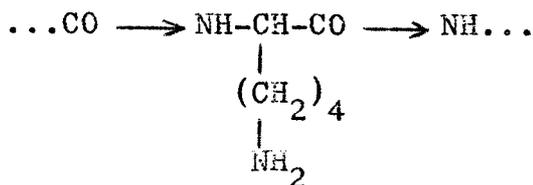
- Structure tridimensionnelle possible



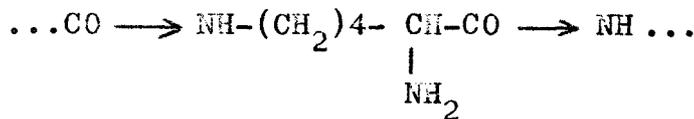
- Existence de l'  $\epsilon$  -mono-DNP-lysine

et de l'  $\alpha$  -mono-DNP-Lysine

rapport  $\frac{\epsilon}{\alpha} = 2$ , d'où prédominance des enchainement de type  $\epsilon$



sur ceux de type



4°) Condensation de l'acide aspartique, du monochlorhydrate de lysine et de la tyrosine en présence d'acide pyroglutamique

La condensation a été effectuée pendant 24 heures à 165°C à partir d'un mélange dans les proportions molaires suivantes : acides pyroglutamique : 4 ; acide aspartique : 4 ; monochlorhydrate de lysine : 3 ; tyrosine : 2. Après hydrolyse des cycles imides

dans la soude diluée, le produit brut de condensation a été dialysé. La fraction adialysable homogène en ultracentrifugation a un poids moléculaire moyen de 5.000 (Voir chapitre V).

La composition en aminoacides a été déterminée après hydrolyse totale par la méthode des DNP-aminoacides (tableau B). La prédominance de la lysine (30 %) et de l'acide aspartique (45%) est très nette et le pourcentage dosé dans le peptide est plus élevé que la proportion dans le mélange initial. La proportion de tyrosine (7,5 %) est plus faible que celle du mélange initial.

L'étude de l'hydrolysats total de la fraction adialysable dinitrophénylée, montre que tous les acides aminés peuvent exister en position N-terminale et que le polypeptide formé présente dans certaines régions une structure tridimensionnelle (présence de lysine libre dans l'hydrolysats total). Cependant la lysine se trouve engagée essentiellement dans le polypeptide par son groupement  $\epsilon$ -aminé libre, le rapport  $\frac{\epsilon\text{-DNP-lysine}}{\alpha\text{-DNP-lysine}}$  étant également voisin de 2 (fig. 50).

Sur les polypeptides formés, nous avons essayé la réaction des enzymes protéolytiques purs.(pepsine, trypsine, chymotrypsine, papaïne, carboxypeptidase, leucine-aminopeptidase).

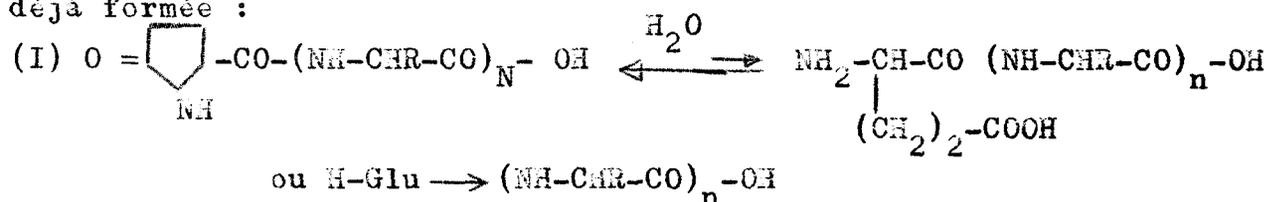
Aucun de ces enzymes n'a eu une action décelable sur ce polypeptide. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que l'acide aspartique, la lysine et peut être l'acide glutamique sont engagés dans des liaisons peptidiques autres que celles qui impliquent les groupes  $\alpha$ -carboxylique et  $\alpha$ -aminé, les enzymes protéolytiques n'agissant que sur les liaisons peptidiques classiques.

CONCLUSIONS de l'ETUDE des PRODUITS DE CONDENSATION DE l'ACIDE PYROGLUTAMIQUE , de l'ACIDE ASPARTIQUE, du MONOCHLORHYDRATE de LYSINE et de la TYROSINE.

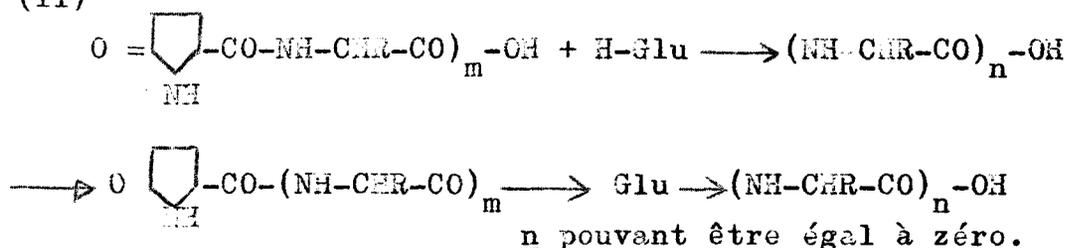
- Etude des Extrémités N-terminale



déjà formée :



(II)



Cette réaction se fait avec une vitesse très faible, car aux températures utilisées, la réaction (I) est très en faveur de la formation du cycle pyroglutamique.

2°) La condensation de l'acide aspartique en présence d'acide pyroglutamique, conduit à des produits de plus haut poids moléculaire, de structure polyimide, hydrolysables en milieu alcalin en acide polyaspartique dont les carboxyles  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent être engagés dans une liaison peptidique.

La facilité avec laquelle se condense l'acide aspartique est mise à profit pour synthétiser des polipeptides de haut poids moléculaire contenant d'autres acides aminés.

3°) La condensation de la lysine (monochlorhydrate), conduit à des produits où la lysine peut être engagée soit par son groupement  $\alpha$ -aminé soit par son groupement  $\epsilon$ -aminé, mais avec une prédominance de liaisons  $\alpha$ .

Parfois même, la lysine peut être engagée par ses deux groupements aminés, ce qui confère au polypeptide une structure tridimensionnelle.

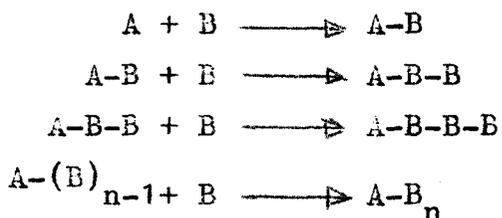
H)- CONCLUSIONS

A la suite de l'étude de la structure des produits de condensation obtenus par chauffage de l'acide pyroglutamique avec un amino-acide neutre, on peut avancer une hypothèse sur le processus de polycondensation.

L'acide pyroglutamique (A) que l'on peut qualifier "d'initiateur" réagit sur une molécule (B) pour donner un peptide A-B.

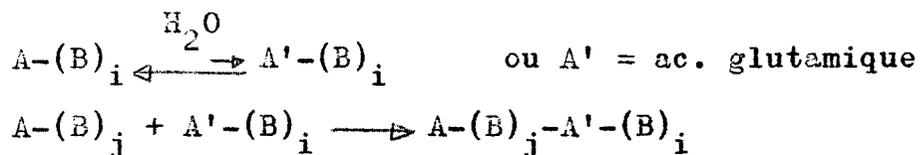
Le peptide A-B possédant comme l'acide pyroglutamique une fonction carboxylique libre peut lui aussi réagir sur une autre molécule de B pour donner un peptide A-B-B.

Le processus peut ainsi se poursuivre jusqu'à épuisement des molécules B.



Il faut faire remarquer que toutes ces réactions sont concurrentes, c'est à dire qu'une molécule B peut réagir soit avec une molécule A qui n'a pas encore réagi, soit avec une molécule A-(B)<sub>i</sub> déjà formée.

Un deuxième processus de polycondensation, mais beaucoup plus lent, peut aussi exister :



## CHAPITRE IV

### CINETIQUE =====

#### I)- INTRODUCTION

Il nous a semblé que l'hypothèse émise au chapitre précédent demandait une vérification expérimentale. L'étude cinétique de disparition des réactifs, et d'apparition des produits de condensation va nous permettre de vérifier qualitativement l'hypothèse émise.

De plus, la cinétique de disparition du glycolle pour différents mélanges B, nous permettra de calculer l'ordre de la réaction. Pour apprécier la valeur de ce résultat, il faut évidemment tenir compte du fait que l'absence de solvant ne permet pas de faire varier indépendamment les concentrations des deux partenaires.

Puisque la réaction de polycondensation se fait sans solvant, nous avons dû mesurer le volume réactionnel des mélanges d'acide pyroglutamique et de glycolle. L'évaluation de ces volumes a été faite par mesure des densités des mélanges, par la méthode "dite du flacon". Nous avons comparé les valeurs expérimentales et les valeurs calculées à partir de la densité du glycolle et de celle de l'acide pyroglutamique. Ces valeurs ont été trouvées identiques aux erreurs d'expérience près (tableau C).

#### TABLEAU C

Volumes des mélanges réactionnels pour différents rapports  $\frac{\text{glycolle}}{\text{ac.pyroglutamique}} = \frac{B}{A}$  (volumes occupés par des mélanges contenant chacun  $10^{-3}$  mole de glycolle)

TABLEAU C :

$\frac{B}{A}$	Volume mesuré	Volume calculé
1	0,141 cm <sup>3</sup>	0,140 cm <sup>3</sup>
2	0,094	0,093
3	0,076	0,077
5	0,068	0,065
8	0,060	0,058

La variation du volume réactionnel en fonction du temps a été mesurée pour le mélange  $\frac{B}{A} = 1$  ; elle peut être considérée comme négligeable. (Tableau D)

TABLEAU D

variation du volume réactionnel en fonction du temps de chauffage 170°C pour le mélange  $\frac{B}{A} = 1$

Temps de chauffage	Volume mesuré
0 minutes	0,141 cm <sup>3</sup>
15	0,141
25	0,138

Le tableau (E) rassemble les concentrations initiales du glycolle ( $B_0$ ) et de l'acide pyroglutamique ( $A_0$ ) pour chacun des mélanges étudiés de rapport  $\frac{B}{A} = 1, 2, 3, 5, \text{ et } 8$ .

TABLEAU E

valeur au temps  $t = 0$  des concentrations en glycolle ( $B_0$ )

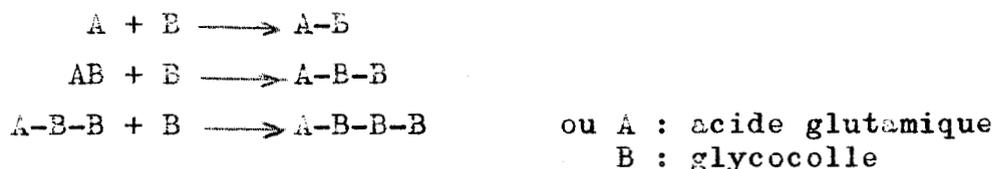
et en acide pyroglutamique ( $A_0$ ) pour différents mélanges  $\frac{B}{A}$

TABLEAU E :

$\frac{B}{A}$	$B_0$	$A_0$
1	$7,143 \cdot 10^{-3}$ mole/cm <sup>3</sup>	$7,143 \cdot 10^{-3}$ mole/cm <sup>3</sup>
2	$10,75 \cdot 10^{-3}$	$5,375 \cdot 10^{-3}$
3	$12,99 \cdot 10^{-3}$	$4,33 \cdot 10^{-3}$
5	$15,38 \cdot 10^{-3}$	$3,076 \cdot 10^{-3}$
8	$17,24 \cdot 10^{-3}$	$2,155 \cdot 10^{-3}$

2)- VERIFICATION CINETIQUE DE L'HYPOTHESE EMISE SUR LE PROCESSUS DE POLYCONDENSATION

Dans le chapitre précédent nous avons émis l'hypothèse que la polycondensation procédait par une suite de réactions consécutives et compétitives du type suivant



Les courbes cinétiques de disparition de A et de B, et les courbes cinétiques d'apparition de AB et ABB doivent vérifier les équations suivantes :

$$-\left(\frac{d[A]}{dt}\right)_{t=0} = -\left(\frac{d[B]}{dt}\right)_{t=0} \quad (I)$$

$$-\left(\frac{d[A]}{dt}\right)_{t=0} = \left(\frac{d[A-B]}{dt}\right)_{t=0} \quad (II)$$

$$\left(\frac{d[A-B-B]}{dt}\right)_{t=0} = 0 \quad (III)$$

Les courbes cinétiques de disparition de A et de B et celles d'apparition de A-B et de A-B-B ont été faites pour le mélange  $\frac{B}{A} = 1$ , à 170°C (fig. 5I). Le glyco-colle (B) a été dosé par potentiométrie (voir chapitre I, Techniques particulières). L'acide pyrôglutamique (A) ainsi que les peptides (A-B) et (A-B-B) ont été dosés après séparation électrophorétique ou chromatographique par la méthode que nous avons décrite au chapitre I.

La mesure de la pente de chaque courbe au temps  $t = 0$  donne les vitesses initiales de disparition des réactifs et d'apparition des produits. (voir tableau F).

TABLERAU F

Valeurs expérimentales des vitesses de disparition de l'acide pyrôglutamique (A) et du glyco-colle (B), et des vitesses d'apparition des peptides A-B et A-B-B. (Température de condensation T = 170°C, rapport  $\frac{B}{A} = 1$ )

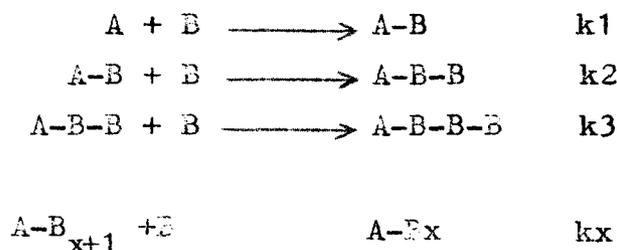
Vitesse initiale	Valeur expérimentale
$-\left(\frac{d[A]}{dt}\right)_{t=0}$	} 0,615.10 <sup>-3</sup> mole/cm <sup>3</sup> mn.
$-\left(\frac{d[B]}{dt}\right)_{t=0}$	
$\left(\frac{d[A-B]}{dt}\right)_{t=0}$	0,59. 10 <sup>-3</sup> mole/cm <sup>3</sup> mn.
$\left(\frac{d[A-B-B]}{dt}\right)_{t=0}$	0

Les résultats expérimentaux confirment bien l'hypothèse émise plus haut sur le processus de polyconcentration : les courbes de disparition de A et de B sont bien tangentes au temps  $t = 0$  (fig. 5I) et la valeur de la vitesse initiale d'apparition de

A-B est identique aux erreurs d'expérience près, aux vitesses initiales de disparition de A et de B. De plus la vitesse initiale d'apparition A-B-B est égale à zéro.

### III)- ETUDE THEORIQUE DE LA CINETIQUE DE LA REACTION

soit la suite des réactions suivantes :



où A = acide pyroglutamique  
B = glycocolle

#### 1°) cinétique de disparition du glycocolle

Si l'on suppose que les ordres de réactions sont identiques pour toutes les réactions, la vitesse de disparition du glycocolle est égale à :

$$\begin{aligned}
 V = - \frac{d[B]}{dt} &= k_1 [A]^n [B]^m + k_2 [A-B]^n [B]^m + \dots + k_{x+1} [A-B_x]^n [B]^m \\
 &= [B]^m \left( k_1 [A]^n + k_2 [A-B]^n + \dots + k_{x+1} [A-B_x]^n \right)
 \end{aligned}$$

D'après l'hypothèse de FLORY (17) (\*), les constantes de vitesse de chaque réaction sont égales et l'on peut écrire que la vitesse de disparition du glycocolle est égale à chaque instant à :

$$\begin{aligned}
 V = - \frac{d[B]}{dt} &= k [B]^m \left( [A]^n + [A-B]^n + \dots + [A-B_x]^n \right) \\
 &= k [B]^m [\Delta_0]^n
 \end{aligned}$$

(\*) A la suite de ses travaux sur les cinétiques de polycondensation des diacides sur les diols, FLORY a émis l'hypothèse que les constantes de vitesse de la réaction sont les mêmes pour toutes les réactions. Cette hypothèse a été reprise par AELION (2). Au cours de l'étude de la condensation des -aminoacides (acide amino-11-undécanoïque).

et au temps  $t = 0$   $V_0 = -\left(\frac{d[B]}{dt}\right)_{t=0} = k [B_0]^m [A_0]^n$  -46-

Expérimentalement nous avons mesuré la disparition du glycocolle (B) en fonction du temps pour différents mélanges  $\frac{B}{A}$  dans lesquels les concentrations de A et de B sont variables. Etant donné que l'on ne peut pas faire varier indépendamment les concentrations de A et de B, nous nous trouvons dans l'obligation de faire une supposition sur l'ordre de la réaction par rapport au glycocolle. Supposons cet ordre  $m = 1$  ; nous avons pour mélange  $\frac{B}{A}$  quelconque :

$$v = k [B] [A_0]^n = -\frac{d[B]}{dt}$$

$$\frac{-d[B]}{[B]} = k [A_0]^n dt$$

$$\int_{[B_0]}^{[B]} \frac{d[B]}{[B]} = k [A_0]^n \int_0^t dt$$

$$\text{Log} \frac{[B_0]}{[B]} = k [A_0]^n t = Kt$$

Si  $m = 1$ , en exprimant graphiquement  $\text{Log} \frac{B_0}{B}$  en fonction de  $t$ , on doit avoir une droite de pente :

$$K = k [A_0]^n$$

On peut aussi calculer la valeur de  $K$  pour différents mélanges  $\frac{B}{A}$

$$K = k [A_0]^n$$

$$\log K = \log k = n \log [A_0]$$

en exprimant graphiquement  $\log k$  en fonction de  $\log A_0$  on peut déterminer l'ordre  $n$  et la constante  $k$ .

La cinétique d'apparition des peptides peut être suivie par la réaction du biuret. Les pentes au temps  $t = 0$  des courbes donnant la variation du biuret en fonction du temps pour différents rapports  $B/A$ , expriment les vitesses initiales  $V_0$  d'apparition du peptide A-B pour ces mêmes rapports.

$$V_0 = \frac{d[A-B]}{dt} = k [A_0]^n [B_0]^m$$

Comme on ne peut faire varier indépendamment les concentrations de A<sub>0</sub> et de B<sub>0</sub> vu l'absence de solvant, on peut comme précédemment faire une supposition sur l'ordre de la réaction par rapport au glyco-colle (B).

En supposant  $m = 1$  on peut calculer l'ordre par rapport à A. En effet pour chaque mélange  $\underline{B}$  on peut calculer  $\frac{V_0}{[Bo]}$  ( $V_0$  étant la pente à l'origine des courbes exprimant la variation du biuret en fonction du temps.) (fig. 52).

$$\frac{V_0}{[Bo]} = k [A_0]^n$$

$$\log \frac{V_0}{[Bo]} = \log k + n \log [A_0]$$

En portant graphiquement  $\log \frac{V_0}{[Bo]}$  en fonction de  $\log [A_0]$  on doit avoir une droite de pente n.

#### IV)- CINETIQUE d'APPARITION DES POLYPEPTIDES : VARIATION de l'INTENSITE DU BIURET EN FONCTION DU TEMPS.

La variation de l'intensité du biuret en fonction du temps a été faite pour les mélanges d'acides pyroglutamique (A) et de glyco-colle (B) de rapport  $\underline{B} = 1, 2, 3$  et 5. Pour interpréter les données cinétiques de la variation du biuret, il faut que la densité optique du biuret soit exprimée en fonction du volume réactionnel.

Or, la densité optique D du biuret a été mesurée pour une solution à 1 mg de peptides par millilitre. Il faut, à partir de D exprimé pour 1 mg/ml, calculer la densité optique D' qui donnerait un volume identique de polypeptide par millilitre de solution, c'est à dire exprimer D' en  $10^{-3} \text{ cm}^3/\text{ml}$  ou  $\text{mm}^3/\text{ml}$ . Il suffit pour cela de multiplier D par la densité de chaque mélange pour avoir D'. Les résultats sont reproduits dans le tableau(G) et la figure (52).

TABLEAU G

VARIATIONS DE LA DENSITE OPTIQUE DU BIURET  
EN FONCTION DU TEMPS POUR LES RAPPORTS B/A de 1, 2, 3 et 5

t en mn	B/A = 1		B/A = 2		B/A = 3		B/A = 5	
	D	D'	D	D'	D	D'	D	D'
0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0,168	0,245	0,167	0,251	0,124	0,190	0,095	0,143
30	0,227	0,331	0,266	0,399	0,241	0,370	0,180	0,280
45	0,238	0,347	0,301	0,452	0,295	0,453	0,238	0,370
60	0,238	0,347	0,309	0,463	0,315	0,484	0,265	0,412
75	0,243	0,355	0,321	0,482	0,330	0,506	0,313	0,486
105	0,231	0,337	0,312	0,468	0,334	0,512	0,323	0,502
135	0,244	0,356	0,314	0,472	0,345	0,530	0,337	0,523
150	0,240	0,350	0,314	0,472	0,366	0,563	0,354	0,550
180	0,267	0,390			0,355	0,545	0,368	0,572

D = Densité optique exprimée pour une concentration de 1mg de peptides par millilitre

D' = Densité optique exprimée pour une concentration de 1 mm3 de peptides par millilitre de solution.

Les courbes de la figure (52) permettent de mesurer la pente au temps  $t = 0$  (vitesse d'apparition des peptides à l'instant initial) soit  $V_0 = \frac{dD}{dt}$

Si  $n$  était égal à 1, on aurait :

$$\frac{V_0}{[Bo]} = k [Ao]^n$$

En exprimant  $\frac{V_0}{Bo}$  en fonction de  $Ao$  (tableau H) on devrait avoir une droite. En fait, expérimentalement nous avons trouvé une courbe (fig. 53). En supposant  $n =$  quelconque et en exprimant graphiquement  $\log \frac{V_0}{Bo} = F. (\log Ao)$  (tableau H et figure 54) on obtient une droite dont la pente "n" est égale à 1,85.

Cette valeur s'approche de 2. Mais nous avons jugé utile de confirmer ce résultat en étudiant la cinétique de disparition du glyocolle.

TABLEAU H

tableau synoptique des valeurs de  $V_0$   $[Bo]$  et  $[Ao]$  et des valeurs déduites de celles-ci.

$\frac{B}{A}$	$V_0$	$[Bo]$	$\frac{V_0}{[Bo]}$	$\log \frac{V_0}{[Bo]}$	$[Ao]$	$-\log [Ao]$
1	$2,14 \cdot 10^{-2}$	$7,143 \cdot 10^{-3}$	3	0,477	$7,143 \cdot 10^{-3}$	2,146
2	$1,67 \cdot 10^{-2}$	$10,75 \cdot 10^{-3}$	1,55	0,190	$5,375 \cdot 10^{-3}$	2,270
3	$1,29 \cdot 10^{-2}$	$12,99 \cdot 10^{-3}$	0,994	-0,002	$4,33 \cdot 10^{-3}$	2,363
5	$0,99 \cdot 10^{-2}$	$15,38 \cdot 10^{-3}$	0,644	-0,191	$3,076 \cdot 10^{-3}$	2,512
:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:

V)- CINETIQUE DE DISPARITION DU GLYCOLLE - ORDRE DE LA REACTION

La cinétique de disparition du glyocolle a été faite pour les mélanges de rapport  $\frac{B}{A} = 1, 2, 3, 5$  et 8 ; chaque

mélange contenant au départ  $1.10^{-3}$  mole de glycolle. Les concentrations  $[B]$  sont calculées en divisant le nombre de moles de glycolle dosé (NB) par le volume des mélanges réactionnels (tableau I). Les courbes de variation du glycolle en fonction du temps pour les différents mélanges sont reproduites (fig. 55 et fig. 56).

Si l'on suppose que l'ordre de la réaction est  $m = 1$  par rapport au glycolle (voir paragraphe II, étude théorique) on doit obtenir des droites de pente  $K = k [A_0]^n$  en exprimant graphiquement  $\log \frac{[B_0]}{[B]}$  en fonction du temps (fig. 57). En fait, les courbes obtenues ne sont linéaires que pendant les premiers temps de réaction.

Il semble donc que l'ordre de la réaction est  $m = 1$  par rapport au glycolle. L'abaissement de la constante de vitesse au bout d'un certain temps de réaction peut être dû à ce que la réaction est équilibrée.

La pente des droites obtenues à la figure 57, est égale à :

$$K = k [A_0]^n$$

$$\log K = \log k + n \log [A_0]$$

Pour chacune des valeurs de  $K$ , correspond une valeur de  $[A_0]$ . Si l'on exprime graphiquement  $\log K$  en fonction de  $\log [A_0]$  (tableau I) on peut calculer  $n$  (pente de la droite) et  $\log k$  (ordonnée à l'origine) (fig. 58).

Nous avons trouvé :  $n = 2,04$

$$\log k = 3,27$$

$$k = 1,86.10^{-3} \text{ (mole/cm}^3\text{)}^2 \cdot \text{mn}^{-1}$$

Donc, dans le cas de la cinétique de disparition du glycolle, nous avons trouvé une valeur très proche de 2.

TABLEAU I

$\frac{h}{\lambda} = 1$			$\frac{h}{\lambda} = 2$			$\frac{h}{\lambda} = 3$			$\frac{h}{\lambda} = 4$			$\frac{h}{\lambda} = 5$			$\frac{h}{\lambda} = 6$			
$\lambda$ (Å)	$\log \frac{h}{\lambda}$	$(10^{-3} \text{ mole cm}^{-3})$	$\log \frac{h}{\lambda}$	$(10^{-1} \text{ mole cm}^{-1})$	$\log \frac{h}{\lambda}$	$(10^{-3} \text{ mole cm}^{-3})$												
1	0,714	1,143	0,014	10,72	0,07	1,090	12,99	1	0,004	13,28	0	1	15,28	0	1	17,20	0	0,003
2	0,354	0,42	0,031	10,58	0,031	0,852	12,86	1	0,021	13,38	0	1	13,38	0	1	17,10	0	0,003
3	0,237	3,91	0,083	10,52	0,054	0,925	12,38	2	0,034	14,78	0	3	14,78	0	2	16,4	0	0,003
4	0,173	5,24	0,134	9,5	0,074	0,900	12,02	3	0,046	14,33	0	3	14,33	0	3	15,9	0	0,004
5	0,140	4,94	0,162	9,34	0,075	0,896	11,70	4	0,053	13,60	0	4	13,60	0	4	15,23	0	0,004
6	0,117	4,54	0,189	9,13	0,075	0,896	11,25	5	0,063	13,12	0	5	13,12	0	5	14,75	0	0,004
7	0,100	4,30	0,217	8,97	0,075	0,896	10,85	6	0,075	12,98	0	6	12,98	0	6	14,22	0	0,004
8	0,089	4,10	0,245	8,87	0,075	0,896	10,50	7	0,085	12,82	0	7	12,82	0	7	13,80	0	0,004
9	0,080	3,95	0,272	8,80	0,075	0,896	9,85	8	0,092	12,72	0	8	12,72	0	8	13,40	0	0,004
10	0,074	3,82	0,300	8,74	0,075	0,896	9,48	9	0,100	12,62	0	9	12,62	0	9	13,00	0	0,004
12	0,065	3,60	0,353	8,68	0,075	0,896	8,83	10	0,110	12,52	0	10	12,52	0	10	12,70	0	0,004
15	0,055	3,35	0,407	8,62	0,075	0,896	8,48	12	0,122	12,42	0	12	12,42	0	12	12,30	0	0,004
20	0,042	3,05	0,461	8,56	0,075	0,896	8,13	15	0,137	12,32	0	15	12,32	0	15	12,00	0	0,004
25	0,034	2,80	0,515	8,50	0,075	0,896	7,78	20	0,155	12,22	0	20	12,22	0	20	11,70	0	0,004
30	0,029	2,60	0,569	8,44	0,075	0,896	7,42	25	0,172	12,12	0	25	12,12	0	25	11,40	0	0,004
35	0,025	2,45	0,623	8,38	0,075	0,896	7,07	30	0,187	12,02	0	30	12,02	0	30	11,10	0	0,004
40	0,022	2,30	0,677	8,32	0,075	0,896	6,72	35	0,201	11,92	0	35	11,92	0	35	10,80	0	0,004
45	0,020	2,20	0,731	8,26	0,075	0,896	6,37	40	0,215	11,82	0	40	11,82	0	40	10,50	0	0,004
50	0,018	2,10	0,785	8,20	0,075	0,896	6,02	45	0,228	11,72	0	45	11,72	0	45	10,20	0	0,004
55	0,017	2,05	0,839	8,14	0,075	0,896	5,67	50	0,241	11,62	0	50	11,62	0	50	9,90	0	0,004
60	0,016	2,00	0,893	8,08	0,075	0,896	5,32	55	0,254	11,52	0	55	11,52	0	55	9,60	0	0,004
70	0,014	1,90	1,007	8,02	0,075	0,896	4,87	60	0,267	11,42	0	60	11,42	0	60	9,30	0	0,004
80	0,013	1,85	1,121	7,96	0,075	0,896	4,52	65	0,280	11,32	0	65	11,32	0	65	9,00	0	0,004
90	0,012	1,80	1,235	7,90	0,075	0,896	4,17	70	0,293	11,22	0	70	11,22	0	70	8,70	0	0,004
100	0,011	1,75	1,349	7,84	0,075	0,896	3,82	75	0,306	11,12	0	75	11,12	0	75	8,40	0	0,004
120	0,010	1,70	1,563	7,78	0,075	0,896	3,17	80	0,320	11,02	0	80	11,02	0	80	8,10	0	0,004
150	0,009	1,65	1,987	7,72	0,075	0,896	2,52	85	0,334	10,92	0	85	10,92	0	85	7,80	0	0,004
200	0,008	1,60	2,811	7,66	0,075	0,896	1,87	90	0,348	10,82	0	90	10,82	0	90	7,50	0	0,004
250	0,007	1,55	3,635	7,60	0,075	0,896	1,52	95	0,362	10,72	0	95	10,72	0	95	7,20	0	0,004
300	0,006	1,50	4,459	7,54	0,075	0,896	1,17	100	0,376	10,62	0	100	10,62	0	100	6,90	0	0,004
400	0,005	1,45	6,083	7,48	0,075	0,896	0,82	100	0,390	10,52	0	100	10,52	0	100	6,60	0	0,004
500	0,004	1,40	8,707	7,42	0,075	0,896	0,47	100	0,404	10,42	0	100	10,42	0	100	6,30	0	0,004
600	0,003	1,35	11,331	7,36	0,075	0,896	0,12	100	0,418	10,32	0	100	10,32	0	100	6,00	0	0,004
700	0,002	1,30	15,955	7,30	0,075	0,896	0,05	100	0,432	10,22	0	100	10,22	0	100	5,70	0	0,004
800	0,002	1,25	21,579	7,24	0,075	0,896	0,02	100	0,446	10,12	0	100	10,12	0	100	5,40	0	0,004
900	0,001	1,20	29,203	7,18	0,075	0,896	0,01	100	0,460	10,02	0	100	10,02	0	100	5,10	0	0,004
1000	0,001	1,15	39,827	7,12	0,075	0,896	0,00	100	0,474	9,92	0	100	9,92	0	100	4,80	0	0,004



VI)- VERIFICATION DE LA CONSTANDE DU RAPPORT  $k = \frac{V_0}{[A_0]^2 [B_0]}$

TABLEAU J.-

Valeurs de k calculées à partir de la vitesse initiale de disparition du glycolle

$\frac{B}{A}$	$V_0$ mole.cm <sup>-3</sup> . mn	$\frac{[A_0]^2}{(mole.cm^{-3})^2}$	$\frac{[B_0]}{mole.cm^{-3}}$	$\frac{[A_0]^2 [B_0]}{(mole.cm^{-3})^3}$	$\frac{k}{(mole.cm^{-3})^2}$ mn.
1	0,616.10 <sup>-3</sup>	51,02.10 <sup>-6</sup>	7,143.10 <sup>-3</sup>	365.10 <sup>-9</sup>	1,69.10 <sup>3</sup>
2	0,550.10 <sup>-3</sup>	28,8.10 <sup>-6</sup>	10,75.10 <sup>-3</sup>	310.10 <sup>-9</sup>	1,78.10 <sup>3</sup>
3	0,428.10 <sup>-3</sup>	18,8.10 <sup>-6</sup>	12,99.10 <sup>-3</sup>	244,2.10 <sup>-9</sup>	1,75.10 <sup>3</sup>
5	0,285.10 <sup>-3</sup>	9,45.10 <sup>-6</sup>	15,38.10 <sup>-3</sup>	145,2.10 <sup>-9</sup>	1,96.10 <sup>3</sup>
8	0,182.10 <sup>-3</sup>	4,65.10 <sup>-6</sup>	17,24.10 <sup>-3</sup>	80,2.10 <sup>-9</sup>	2,27.10 <sup>3</sup>

Les différentes valeurs de K se situent aux environs de la valeur de  $k = 1,86.10^3 (mole/cm^3)^2 \text{ minute}^{-1}$  calculée précédemment. On peut cependant remarquer que la valeur de k augmente un peu avec le rapport  $\frac{B}{A}$

VII)- DISCUSSION

Le fait que l'ordre de la réaction de condensation d'un amino-acide avec l'acide pyroglutamique soit égal à deux par rapport à cet acide peut sembler curieux.

Cependant, les études cinétiques faites sur la polycondensation thermique des acides  $\omega$ -aminés et sur les condensations des diacides sur des diols ou des diamines, en proportions moléculaires montrent que la réaction est d'ordre 3 quand la réaction est catalysée par un acide (CHAMPETIER) (12) et (FLORY) (17), et que dans ces conditions, on peut écrire :

$$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C_{\text{cat}} \cdot C^2$$

Quand la réaction n'est pas catalysée, l'expérience montre que la réaction est encore d'ordre 3 et la vitesse peut s'exprimer par la relation

$$-\frac{dC}{dt} = k C^3$$

D'après CHAMPETIER, les groupes terminaux acides jouent le rôle de catalyseur.

Nous pouvons donc comparer nos résultats avec ceux de CHAMPETIER et FLORY, à savoir que la réaction de condensation est une réaction d'ordre 3 et que cette réaction est catalysée par les groupes acides. FOX (20)(21) et HARADA (29) avaient observé en effet que l'acide phosphorique ajouté à faible dose dans le milieu réactionnel favorisait la réaction de condensation des acides aminés avec l'acide pyroglutamique.

L'acide pyroglutamique joue donc deux rôles, un rôle d'initiateur et un rôle de catalyseur. Nous avons voulu vérifier s'il n'existait pas d'autres acides pouvant jouer les mêmes rôles que l'acide pyroglutamique et favoriser la condensation des amino-acides. Nous avons pu ainsi remarquer que d'autres composés acides dont le point de fusion était

compris entre 120° et 170° pouvaient remplacer l'acide pyroglutamique. C'est le cas de l'acide adipique, de l'acide salicylique, des acides acétyl aminoacides tel que l'acétylméthionine. Tous ces composés réagissent avec le glycolle de la même manière que l'acide pyroglutamique et donnent au cours de la réaction des séries homologues de produits de condensation de composition croissante en glycolle et que l'on peut séparer facilement en chromatographie.

L'anhydride phtalique semble cependant ne donner qu'un seul produit de condensation ; cette propriété a été mise à profit dans la synthèse peptidique pour le blocage des groupements aminés.

D'autres acides au contraire ne réagissent pas avec le glycolle, c'est le cas de l'acide benzoïque, de l'acide méthanitrobenzoïque et de l'acide stéarique.

#### CONCLUSION

La cinétique de polycondensation de l'acide pyroglutamique et du glycolle permet de vérifier que l'acide pyroglutamique joue un rôle d'initiateur dans la réaction de polycondensation et que la réaction évolua t par une suite de réactions consécutives et compétitives, vérifiant l'hypothèse émise au chapitre III sur le processus de polycondensation.

Nous avons pu mettre en évidence que la réaction était d'ordre 3, l'ordre par rapport à l'acide pyroglutamique étant de 2, et que ces résultats étaient en accord avec les résultats obtenus par polycondensation des diacides avec des diamines ou des diols.

Enfin, nous avons remarqué que d'autres acides pouvaient jouer le même rôle que l'acide pyroglutamique et que d'autres acides n'avaient aucune action.

## CHAPITRE V

### CONDENSATION THERMIQUE DES ACIDES AMINES BASIQUES (lysine, ornithine, acide diaminobutyrique) SOUS LEUR FORME BASE.

#### INTRODUCTION

Dans la série des acides aminés acides, les acides aspartique et glutamique ont un comportement très différent quand ils sont chauffés ; l'acide glutamique se deshydrate en sa lactame, l'acide pyroglutamique, tandis que l'acide aspartique se polycondense en une polyimide.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de rechercher les particularités de comportement de la série des acides aminés basiques.

La lysine base, chauffée seule ou en présence d'autres acides aminés se polycondense facilement en donnant des résines ou des gels de structure tridimensionnelle (HARADA)(28)

Nous avons repris ces travaux pour étudier la structure de ces polylysines et comparer en même temps les comportements de deux autres acides aminés basiques, l'ornithine et l'acide diaminobutyrique.

#### A)- CONDENSATION DE LA LYSINE BASE

La lysine base est livrée dans le commerce sous la forme d'une solution aqueuse concentrée. Cette solution est deshydratée par chauffage au bain d'huile à 100°C et le résidu porté à 160-170°C en vue de la condensation.

Après un certain temps de chauffage, la résine obtenue est additionnée d'eau. La majeure partie est très soluble dans l'eau. Cependant une certaine quantité d'une fraction insoluble qui se présente sous la forme de petites pellicules peut se déposer.

La solution est mise en dialyse contre de l'eau distillée et les fractions adialysables et dialysables

sont lyophilisées. Le rapport  $\frac{\text{adialysable}}{\text{dialysable} + \text{adialysable}}$  est de 47p. 100 (en poids)

La structure de la fraction adialysable a été étudiée par la méthode de dinitrophénylation de SANGER (43).

Après hydrolyse totale du DNP-peptide, nous pouvons extraire la di-DNP-lysine par l'éther et les dérivés monodinitrophénylés de la lysine par le butanol secondaire. Ceux-ci sont séparés en électrophorèse à pH 11 (fig. 59).

La fraction aqueuse contient encore de la lysine libre, non dinitrophénylée : la structure de la polylysine est donc tridimensionnelle.

Le dosage respectif de la Di-DNP lysine,  
de l' $\alpha$ -DNP lysine  
de l' $\epsilon$ -DNP-lysine,  
de la lysine libre

a donné les résultats suivants :

$$\frac{\alpha \text{ -DNP Lys}}{\epsilon \text{ -DNP Lys}} = 9,3$$

$$\frac{\text{Lysine}}{\text{Di-DNP-Lysine}} = 2,87$$

$$\frac{\alpha\text{-DNP-Lys} + \epsilon\text{-DNP-Lys}}{\text{Di-DNP-Lys}} = 9,05$$

$$\frac{\alpha\text{-DNP-lysine} + \epsilon\text{-DNP-lysine}}{\text{Lysine}} = 3,15$$

### COMMENTAIRE

Les commentaires des résultats obtenus sont assez délicats, parce que nous avons l'impossibilité de savoir si la dinitrophénylation du peptide est complète (\*). Dans ces conditions, le dosage de la lysine libre (après hydrolyse) est

(\*) Dans la série des protéines et au cours des réactions de dinitrophénylation, il est classique de parler de groupements aminés masqués, inaccessible au dinitrofluorobenzène. Ces observations de SANGER sur les groupements "non réactifs" de diverses protéines sont significatives.



précipité. Après une demi-heure d'agitation à température ordinaire, la solution est séparée du précipité par filtration. Une certaine quantité d'argent, qui s'est complexé à l'ornithine est précipité par barbotage de  $H_2S$  exempt d'acide chlorhydrique. Après filtration, la solution d'ornithine base est chauffée à  $70^{\circ}C$  pour éliminer l'hydrogène sulfuré.

La solution d'ornithine base est concentrée à un petit volume, par ébullition à  $100^{\circ}C$ . Le produit obtenu est hétérogène en électrophorèse (à pH 3,9) et en chromatographie. En effet, en plus de l'ornithine, on sépare en faible quantité, un composé révélabl par la ninhydrine et par la réaction de PAN et DUTCHER qui a un comportement plus basique en électrophorèse et un RF plus grand que l'ornithine (fig. 6I).

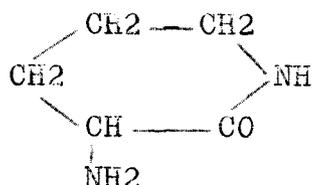
La solution concentrée d'ornithine base a été chauffée 120 minutes à  $130^{\circ}C$ . Nous avons remarqué que l'ornithine base se transformait dans ces conditions, et avec un assez bon rendement, en un dérivé dont le comportement était comparable à celui découvert dans la solution concentrée d'ornithine base. En vue de la détermination de sa structure, ce produit de condensation de l'ornithine a été récupéré après séparation chromatographique. Après hydrolyse totale acide ( $HCl$  5,6 N  $105^{\circ}C$  - 24 heures) l'hydrolysats contient de l'ornithine. Ce composé a été dinitrophénylé par la méthode de SANGER et extrait du milieu réactionnel par le butanol secondaire. Après hydrolyse totale de ce dérivé dinitrophénylé, on extrait par le butanol secondaire un dérivé monodinitrophénylé de l'ornithine, qui a été identifié par électrophorèse à pH 9,1 (tampon borate) comme étant l' $\alpha$ -DNP-ornithine (fig. 60).

Il a été vérifié que la phase aqueuse de l'hydrolysats ne contenait pas d'ornithine libre. Le produit de condensation de l'ornithine base a donc les propriétés générales suivantes :

- révélabl par la ninhydrine
- révélabl par la réaction de PAN et DUTCHER

- ne contient que de l'ornithine
- ne donne qu'un seul dérivé dinitrophénylé de l'ornithine : l' $\alpha$ -DNP ornithine
- ne possède pas d'ornithine dont les deux fonctions aminées sont bloquées.

Il s'agit donc de la lactame de l'ornithine.



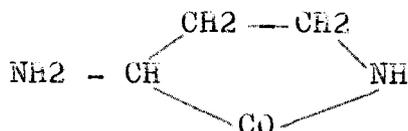
C)- CONDENSATION DE L'ACIDE DIAMINOBUTYRIQUE "BASE"

L'acide diaminobutyrique dichlorhydrate a été préparé à partir de l'acide L-glutamique par la méthode de ADAMSON (1).

L'acide diaminobutyrique "base" a été préparé à partir du dichlorhydrate par une technique comparable à celle que nous avons utilisée pour l'ornithine (voir plus haut).

La solution de diaminobutyrique base concentrée à petit volume a été chauffée à 170°C pendant 45 minutes. Après électrophorèse du résidu obtenu, on sépare en plus de l'acide diaminobutyrique un composé plus basique en électrophorèse qui possède le même comportement que la lactame de l'ornithine. (Fig. 6I).

Par chauffage on obtient la lactame de l'acide diaminobutyrique:



En conclusion générale de ce chapitre, il est important d'opposer les comportements de la lysine et de deux autres acides aminés basiques de la même série, l'

ornithine et l'acide  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyrique. Toutefois, l'identification de la lactame de l'ornithine et de celle de l'acide  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyrique après chauffage est en faveur du mécanisme proposé plus haut pour la formation des polylysines à partir de la lactame.

## CHAPITRE VI

### PROPRIETES PHYSIQUES, CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

#### A)- CARACTERE de SOLUBILITE

Tous les polypeptides synthétiques sont solubles dans l'acide formique, dans l'hydrate de phénol et dans l'urée 10 M.

Cependant, leur solubilité dans l'eau est influencée par leur caractère acide et elle varie suivant la nature des acides aminés constitutifs :

- Les polyalanines sont entièrement solubles dans l'eau ;

- Les polyglycocolles deviennent insolubles dans l'eau dès que le nombre de résidus de glycolle devient supérieur à 10.

- Les polyphénylalanines se répartissent en plusieurs fractions l'une insoluble, possédant 6,9 molécules de phénylalanine pour 1 molécule d'acide glutamique, l'autre soluble dans la soude diluée, une partie de cette dernière étant insoluble en milieu acide et possédant en moyenne 3,1 molécules de phénylalanine pour 1 molécule d'acide glutamique.

- Les polylysines sont très solubles dans l'eau.

- Les polypeptides contenant de l'acide aspartique sont insolubles dans l'eau, mais solubles en milieu alcalin. Le traitement alcalin transforme la structure polyimide du polymère brut en une structure "poly-acide aspartique".

#### B)- SPECTRE d'ABSORPTION des REACTIONS DU BIURET DE DIFFERENTS POLYMERES.

Afin d'avoir une idée de la taille des peptides synthétisés, nous avons étudié le spectre d'absorption de la coloration du biuret de différents polymères.

Le maximum d'absorption de la coloration du biuret des protéines (sérum albumine, caséine) se situe vers 550 m $\mu$  (KOBBER et SUGIURA) (33). D'après KOBBER (34), les oligopeptides donnent un complexe semi-biuret dont les maxima d'absorption se déplacent vers les grandes longueurs d'ondes, le complexe des tripeptides donnant un maximum d'absorption à 582 m $\mu$  (GAWRILLOW et coll.) (23).

Nous avons reproduit sur la figure (62), les spectres d'absorption du biuret de différents polymères obtenus par chauffage de l'acide pyroglutamique et du glycocolle. Nous avons notamment comparé les produits dialysables et adialysables.

On peut remarquer que les polymères dialysables ont un maximum d'absorption au delà de 550 m $\mu$  et que les fractions adialysables ont un maximum d'absorption se rapprochant de 550 m $\mu$ , qui est donc voisin de celui que l'on obtient avec des protéines "vraies".

### C)- POIDS MOLECULAIRE

Dans les chapitres précédents, nous avons particulièrement étudié la structure de plusieurs oligopeptides obtenus par condensation de l'acide pyroglutamique avec d'autres amino-acides. Nous avons même déterminé par une méthode chimique le poids moléculaire moyen de certains d'entre eux : par exemple la fraction insoluble des polyglycocolles a un poids moléculaire moyen de 800, ce qui correspond en moyenne à un tridécapptide.

Nous avons également signalé que la condensation de l'acide pyroglutamique avec d'autres acides aminés, en présence d'acide aspartique, conduisait à des produits de condensation de haut poids moléculaire. Nous nous sommes donc attachés à déterminer d'une façon précise le poids moléculaire de ces produits particuliers.

Trois séries de dérivés ont été étudiées. Ils correspondent à trois mélanges différents dont la composition précise est rassemblée dans le tableau K.

Dans ce même tableau, la composition de l'adialysable obtenu est également donné. Les proportions observées sont très différentes de celles du mélange initial.

Les trois polypeptides ont été étudiés en électrophorèse de zone sur papier à pH 3,9 et à pH 8,9 : après révélation de l'amidoschwarz, qui est un colorant spécifique des protéines, on décèle sur l'électrophorégramme de chaque produit, une seule bande précise et bien délimitée. Ces produits de condensation présentent donc une certaine homogénéité électrophorétique. Cette propriété peut s'expliquer par le fait que la condensation des acides aminés dans un mélange se fait au hasard, de telle sorte que les molécules de polypeptides composés d'acides aminés répartis dans un ordre quelconque, peuvent avoir en moyenne des propriétés physiques comparables.

TABLEAU K

Acides aminés polycondensés du mélange initial	Composition du mélange initial (en p. 100)	Acides aminés constitutifs	Composition de l'adialysable (en p. 100)	Condition de condensation	poids moléculaires
Ac. pyroglutamique Ac. aspartique Lysine (HCl)	28,6 28,6 42,8	Ac. glutamique Ac. aspartique Lysine	19 35,6 45,4	24 h. 165°C	5.600
Ac. pyroglutamique Ac. aspartique Lysine (HCl) Tyrosine	30,76 30,76 23,1 15,38	Ac. glutamique Ac. aspartique Lysine Tyrosine	16,7 45,1 30,30 7,9	24 h. 165°C	5.000
Ac. pyroglutamique Ac. aspartique Lysine (HCl) Tyrosine	14,3 28,6 28,6 28,6	Ac. glutamique Ac. aspartique Lysine Tyrosine	15,65 40,35 33,2 10,8	18 h. 170°C	4.600

Poids moléculaire moyen et composition en amino acides  
des polypeptides obtenus par condensation de plusieurs amino acides.

La détermination du poids moléculaire des fractions adialysables a été effectuée par ultracentrifugation (\*). Les valeurs obtenues sont rassemblées dans le tableau K : elles sont de l'ordre de 5.000 (5.600, 5.000, et 4.600).

(\*) Les déterminations ont été effectuées à la Station Centrale d'ultracentrifugation du C.N.R.S. Nous tenons à remercier tout particulièrement Madame S. FILLITI - WURMSER.

La masse moléculaire mesurée par ultracentrifugation a pour expression :

$$M = \frac{S}{D} \frac{RT}{1 - v_d}$$

R =  $8,313 \cdot 10^7$  erg. mole<sup>-1</sup>  
T = Température absolue  
V = volume spécifique du peptide  
 $\bar{v}$  = densité du solvant  
S = coefficient de sédimentation  
D = coefficient de diffusion

La mesure du rapport  $\frac{S}{D}$  a été effectuée pendant l'approche de l'équilibre de Sédimentation par la méthode d'ARCHIBALD modifiée par EHRENBERG.

$$\frac{S}{D} = \frac{Y}{\omega^2 r K (A_s - A)}$$

où y = distance de la ligne de base à l'intersection de la courbe et du ménisque  
 $\omega$  = vitesse angulaire  
r = distance du ménisque à l'axe de rotation  
K = inverse de l'agrandissement de l'image de la cellule  
A = surface comprise entre la courbe, le ménisque et la ligne de base  
A<sub>s</sub> = surface comprise entre la courbe et la ligne de base après avoir formé une frontière entre le solvant et la solution.

Pour chaque polypeptide, la mesure du rapport  $\frac{S}{D}$  est faite à différents intervalles de temps. La diminution du rapport  $\frac{S}{D}$  en fonction du temps, indique une certaine hétérogénéité (tableau L et tableau M). La valeur de  $\frac{S}{D}$  prise pour le calcul de la masse moléculaire est la valeur extrapolée au temps  $t = 0$ .

TABLEAU L :

Variation de  $\frac{S}{D}$  en fonction du temps pour le polypeptide de poids moléculaire moyen 5.600

Temps en seconde	$\frac{S}{D} \cdot 10^7$
918	0,819
2838	0,807
5718	0,707

TABLEAU M :

Variation de  $\frac{S}{D}$  en fonction du temps pour le polypeptide de poids moléculaire moyen 5.000

Temps en seconde	$\frac{S}{D} \cdot 10^7$
994	0,7956
2914	0,7494
4114	0,6778

A partir de ces résultats, on peut conclure que ces polypeptides sont composés de molécules ayant des masses moléculaires différentes et que l'ultracentrifugation ne donne que la masse moléculaire moyenne.

Aucune étude pour la détermination de la distribution pondérale des macromolécules n' a été entreprise.

#### D) - POINT ISOELECTRIQUE

L'homogénéité électrophorétique des polypeptides de haut poids moléculaire, nous a permis de déterminer expérimentalement le point isoélectrique d'un polypeptide.

L'étude a été faite sur un polypeptide de P.M. 4.600 dont la composition en amino-acides est donnée dans le tableau K.

Ce polypeptide est soluble dans l'eau distillée, mais il précipite par addition de faibles quantités d'acide. Le précipité se redissout par addition importante d'acide, le maximum de précipitation ayant lieu vers pH 3. Nous avons voulu préciser cette notion en déterminant expérimentalement le point isoélectrique.

En utilisant la technique d'électrophorèse sur papier, la détermination du point isoélectrique d'une protéine peut se faire par mesure du déplacement électrophorétique à différents pH, dans des tampons de même force ionique à condition de tenir compte de la relation suivante : (\*)

$$V = E + \varepsilon + e$$

où  $V$  = vitesse apparente d'un ion protéique

$E$  = vitesse de la protéine

$\varepsilon$  = courant d'électroendosmose

$e$  = courant d'évaporation

(\*) Pour la théorie, voir MACHEBOEUF (38), KUNKEL (36)  
TISELIUS (52) AUDUBERT et DE MENDE (3)

Expérimentalement, nous avons mesuré le déplacement du peptide à différents pH dans des tampons de force ionique constante, par rapport au déplacement d'une molécule neutre ( par exemple : le glucose) dans les mêmes conditions expérimentales (2,35 volts par cm pendant 4 heures). Le déplacement du peptide par rapport au glucose est porté graphiquement en fonction du pH. Le point où la courbe coupe l'axe des abscisses, donne le point isoélectrique (fig. 63).

Expérimentalement nous avons trouvé :  $P_i \simeq 2,75$

Le point isoélectrique de ce polypeptide est situé dans une zone très acide, ce qui est normal étant donné sa composition où l'on trouve 40,35 % d'acide aspartique et 15,65 % d'acide glutamique.

#### E) - SPECTRE INFRA-ROUGE

Nous avons voulu comparer Les spectres I.R. de nos polypeptides avec ceux des protéines et des peptides linéaires synthétisés par d'autres méthodes. (\*) (Pour l'application de la spectrophotographie infra-rouge aux peptides et protéines, voir ELLIOT (14) (15) (16), BLOUT (11), BAMFORD (4))

Lorsqu'on examine l'absorption infra-rouge d'une protéine, on constate l'existence de deux zones de longueur d'onde intéressantes, la zone de  $3.000 \text{ cm}^{-1}$  et la zone de  $1.700 \text{ cm}^{-1}$ . Cependant, la zone de  $850 \text{ cm}^{-1}$  à  $1.250 \text{ cm}^{-1}$  est également importante, mais difficilement interprétable.

1<sup>o</sup>) - La "zone de  $3.000 \text{ cm}^{-1}$ ".

Il existe deux bandes caractéristiques dans le cas de peptides linéaires, dues aux fonctions -NH-,

l'une à  $3333 \text{ cm}^{-1}$ , très forte,

(\*) Les spectres I.R. ont été réalisés par Monsieur le Professeur GUY de la Faculté de Pharmacie de Paris, que nous tenons à remercier tout particulièrement.

l'autre à  $3090\text{ cm}^{-1}$ , assez forte

Il a été démontré que ces deux bandes étaient dues à la présence de liaisons hydrogène intermoléculaires.

2<sup>e</sup>) - La "zone de  $1.700\text{ cm}^{-1}$ ".

Dans cette zone existe la bande du groupement  $\text{C}=\text{O}$  appartenant à un aldehyde, à une cétone, ou à un acide ( $1.720\text{ cm}^{-1}$ ).

Cette bande ne se retrouve pas dans les polyptides ou les protéines, car il existe peu de groupements  $-\text{COOH}$  par rapport aux groupements amide  $\text{C}-\text{NH}-$  dont les bandes caractéristiques sont à  $1.666\text{ cm}^{-1}$  et  $1.560\text{ cm}^{-1}$ .

Dans les cyclopeptides, la bande à  $1.560\text{ cm}^{-1}$  n'existe pas : c'est donc la bande spécifique des peptides linéaires.

Les spectres de différents peptides étudiés ont été reproduits dans les figures (64), (65), (66), (69), (70).

La comparaison du spectre de l'acide pyroglutamique (fig. 64), de celui du pyroglutamyl glycine de synthèse (fig. 65) et de celui du polyglycocolle insoluble (fig. 66), semble vérifier la structure des polyptides de ce type.

La bande à  $3.090\text{ cm}^{-1}$ , inexistante dans l'acide pyroglutamique (fig. 64) apparaît dans le peptide pyroglutamyl glycine de synthèse (fig. 65) et dans le polyglycocolle (fig. 66).

La bande à  $1.720\text{ cm}^{-1}$  du groupement  $\text{COOH}$  libre que l'on trouve dans le spectre de l'acide pyroglutamique (fig. 64) diminue dans celui du pyroglutamyl glycine de synthèse (fig. 65) et disparaît presque complètement dans celui du polyglycocolle (fig. 66). De même la bande à  $1.560\text{ cm}^{-1}$ , spécifique des peptides linéaires, est inexistante dans le spectre de l'acide pyroglutamique (fig. 64) et apparaît dans celui du pyroglutamyl glycine (fig. 65) et du polyglycocolle (fig. 66).

D'autre part, nous avons comparé les spectres

obtenus avec nos polyglycocolles à ceux des polyglycocolles préparés par d'autres méthodes par ELLIOTT (fig. 67) et à ceux obtenus par condensation thermique par HARADA et FOX (fig. 68). La correspondance entre toutes les séries de spectres est très satisfaisante.

La figure (69) représente le spectre I.R. d'un polymère d'acide aspartique et d'acide pyroglutamique. Les bandes caractéristiques des CO-NH ( $1.666\text{ cm}^{-1}$  et  $1.560\text{ cm}^{-1}$ ) n'existent pratiquement pas, tandis que la bande du C = O ( $1.730\text{ cm}^{-1}$ ) est très importante. De même les bandes du groupement NH peptidiques ( $3.333\text{ cm}^{-1}$  et  $3.090\text{ cm}^{-1}$ ) sont très faibles. Ces résultats confirment la structure spéciale des produits de condensation de l'acide aspartique (voir chapitre IV). FOX (20) attribue l'existence des liaisons imides, à la présence des bandes à  $1.720$  et  $1.780\text{ cm}^{-1}$ .

Enfin, nous avons reproduit sur la figure (70) le spectre d'un polypeptide complexe de poids moléculaire 4.600 (voir tableau K). Nous retrouvons toutes les bandes caractéristiques des peptides linéaires.

#### F)- COMPORTEMENT DES POLYPEPTIDES VIS A VIS DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Nous avons étudié l'action des enzymes protéolytiques vis à vis d'un polypeptide de poids moléculaire moyen de 4.600, composé d'acide glutamique, d'acide aspartique, de tyrosine et de lysine (pour la composition, voir tableau (K). Etant donné la composition de ce polypeptide, plusieurs enzymes protéolytiques étaient susceptibles d'hydrolyser ce peptide : la trypsine, la chymotrypsine, la papaïne, la pepsine, la carboxypeptidase et la leucine-amino-peptidase ont donc été essayées. (\*) Les essais ont été faits selon les méthodes

(\*) La spécificité d'action des endopeptidases et des exopeptidases est actuellement bien précisée à la suite des travaux de nombreux chercheurs sur la structure primaire des peptides et des protéines : la trypsine coupe spécifiquement .../.

classiques d'hydrolyses enzymatiques.

Les techniques d'analyse que nous avons utilisées n'ont pas été capables de mettre en évidence l'hydrolyse du peptide choisi. Cependant FOX (20) a pu déterminer par dosages successifs une action très légère de la pepsine et de la chymotrypsine sur des polypeptides du même type ; il a évalué approximativement qu'il y avait en moyenne une coupure de liaison peptidique par molécule de polypeptide au bout de 7 jours d'incubation, en présence de pepsine.

L'action enzymatique sur les polypeptides que nous synthétisons est obligatoirement réduite du fait que les acides aminés constitutifs sont à la fois de la série L et de la série D, les enzymes ne pouvant hydrolyser que les liaisons peptidiques formées à partir d'acides aminés de la série L.

KRAMPTZ (56) a montré récemment, en faisant ingérer à un rat, un polypeptide marqué au soufre S-35 et synthétisé par chauffage, que ce polypeptide était attaqué par les enzymes du tube digestif ; il trouve que 40 pour cent de la radioactivité du peptide initial est utilisée par le rat.

Rappelons que la carboxypeptidase s'est révélée très active sur les peptides obtenus par condensation de l'acide pyroglutamique avec l'alanine ou avec la phénylalanine (Voir chapitre III). Nous avons pu déterminer que 2,57 pour ceux du poids total de la polyalanine était libéré sous forme d'alanine (fig. 7I). Nous avons notamment précisé la cinétique

(\*).../. les liaisons lysyl-X, la chymotrypsine, la liaison tyrosyl-X, la pepsine peut agir sur les liaisons glutamyl-tyrosine, la papaïne peut hydrolyser de nombreuses liaisons peptidiques impliquant l'acide glutamique (études faites sur l'insuline). Les deux exopeptidases (carboxypeptidase et leucine-amino-peptidase ont une spécificité également bien précisée (Voir chapitre III).

d'action de la carboxypeptidase, sur les peptides à alanine en dosant par un procédé automatique (voir chapitre techniques) l'alanine libérée en fonction du temps. Cette étude a été faite à deux températures différentes : 20°C et 39°C : pendant 4 heures et à pH 8,5 (Fig. 7I)

L'expérience montre que la libération d'alanine en fonction du temps suit une loi logarithmique. Ces courbes montrent également que l'action enzymatique commence dès l'addition de carboxypeptidase dans le mélange.

#### G) - POUVOIR BACTERICIDE des POLYLYSINES

KATCHALSKI et coll. (32) ont étudié dès 1955 l'activité antibiotique des polymères de D, L-ornithine et de co-polymères contenant de l'ornithine. Le polymère d'ornithine possède une activité comparable à celle de la gramicidine.

D'autre part, on connaît des cyclopeptides riches en acide  $\alpha, \gamma$ -diaminobutyrique qui sont doués également d'une activité antibiotique (par exemple, la polymyxine B dont la structure a été déterminée par HAUSMANN (30) et par BISERTE et DAUTREVAUX (8).

Nous nous sommes demandé si les polylysines que nous avons synthétisées à partir de la lysine base, ne possédaient pas un pouvoir bactéricide. Ces recherches ont été faites pour les deux fractions dialysable et adialysable de la polylysine, en utilisant plusieurs souches bactériennes. (\*)

(\*) Nous tenons à remercier Monsieur J. GUILLAUME, Maître de Recherche au CNRS et Monsieur le Professeur R. OSTEUX, ainsi que le Service de Chimie bactérienne de l'Institut Pasteur de Lille (Directeur, Professeur C. GERNEZ-RIEUX) d'avoir bien voulu procéder à ces déterminations. Ces résultats feront l'objet d'une publication ultérieure dans des journaux de bactériologie, et seront repris dans la thèse de Doctorat ès Sciences de J. GUILLAUME.

Le tableau N rassemble les résultats obtenus pour les deux fractions comparativement à la polymyxine, aux histones riches en arginine et aux protamines.

Le pouvoir bactéricide des deux fractions de ces polylysines est donc plus grand que celui des histones et des protamines, et se rapproche de celui de la polyxyxine. Cette constatation est évidemment très intéressante.

#### H)- POUVOIR ANTIGENIQUE DES POLYPEPTIDES

Certains auteurs ont étudié le pouvoir antigénique des polypeptides synthétiques obtenus par la méthode des N-carboxyanhydrides (FRIEDMAN (22), (GILL) (24), (25), (26) (MAURER) (39) , (STAHMANN) (51). Ils ont pu obtenir des immunosérums spécifiques de ces polypeptides par injection à des animaux.

Nous avons essayé de préparer des immunosérums spécifiques de notre polypeptide de P.M. 5.000, en l'injectant au lapin en présence d'adjuvant de FREUND. Aucun anticorps précipitant n'a pu être décelé en utilisant la méthode de double diffusion en gélose décrite par OUCHTERLONY. On ne peut cependant pas conclure à partir des résultats de cette expérience à l'absence de pouvoir antigénique de notre polypeptide, car la réponse immunitaire de l'animal peut en effet échapper à ces méthodes de caractérisation des anticorps et nécessite alors l'utilisation des méthodes sérologiques. FOX (20) n'a pas pu déceler aucun pouvoir antigénique des polypeptides du même genre, en les injectant à des lapins et à des porcs. Il attribue ce manque d'antigénicité au faible poids moléculaire de ces polypeptides.

TABLEAU N  
Pouvoir bactéricide des Polylysines

Souches bactériennes	Polylysine		Histones (fraction riche en arginine)	Protamine Sulfate (Hoffman La Roche)	Polymyxine
	dialysable	adialysable			
E. Coli 71.062	5	5	15	5	5
E. Coli 57.707	10	10	30	10	5
Salmonella para B	50	50	50	100	5
Klebsiella aérogène	50	10	25	5	2
Shigella Sonnei	5	5	2	5	2
Alcalescens	30	5	25	10	5
Proteus morgani	60	2,5	5	5	10
Pseudomonas aéru- giosa	15	10	25	12,5	2,5
Staphylococcus Aureus Oxford	7,5	10	10	25	15

Concentrations minima bactéricides exprimées en  $\mu\text{g}$  par ml. Les suspensions bactériennes lavées (5.00/ml) sont mises en contact durant 1 heure à 37°C avec les solutions d'antibactériens dans un tampon faible à pH 7,2 obtenu par une solution de 20  $\mu\text{g}$  de  $\text{PO}_4 \text{ K}_2\text{H-PO}_4 \text{ KH}_2$  par ml. On étale sur géloses coulées en boîte de Pétri et l'on numère après 18 heures d'étuve à 37°C le nombre de colonies (=bactéries survivantes).

### CONCLUSION

Dans notre travail, nous avons repris l'idée initiale des travaux de HARADA et FOX sur la polycondensation thermique des acides aminés, en orientant principalement nos recherches vers l'étude cinétique de la réaction et la structure des composés formés. Nous avons étudié les différents facteurs qui peuvent influencer la réaction de condensation des acides aminés en présence d'acide pyroglutamique (température, temps, rapports molaires des différents réactifs) et nous avons précisé les conditions optima de réaction, en tenant compte de la stabilité thermique des acides aminés.

La structure des produits de condensation a été étudiée en détail, en particulier les produits de condensation du glyocolle, de l'alanine, de la lysine, de la phénylalanine et de la tyrosine. Dans chacun de ces cas, les résultats sont en faveur d'une structure polypeptidique commençant par l'acide pyroglutamique. Le groupe carbonyle de l'acide pyroglutamique est impliqué dans une liaison peptidique avec le groupe  $\alpha$ -aminé d'un autre acide aminé. La séquence totale est composée de  $n$  unités,  $n$  étant variable. Dans les produits de condensation du glyocolle par exemple, on peut séparer facilement les polypeptides de ce type jusqu'à  $n = 7$ . (pyroglutamyl-glyocolle, pyroglutamyl-glycyl-glyocolle, etc...) Cependant, d'autres réactions impliquant l'ouverture du cycle pyroglutamique sont possibles. On peut en effet séparer après hydrolyse partielle acide des peptides composés d'acide glutamique, et de l'acide aminé utilisé au cours de la polycondensation, ce dernier se trouvant en position N-terminale. En effet, des peptides du type alanyl-glutamique ont été mis en évidence, prouvant ainsi l'existence d'enchaînements -Alanyl-Glutamyl- dans les produits de condensation. Ces résultats montrent que l'acide pyroglutamique peut se décycliser au cours de la réaction pour se condenser sur une chaîne

déjà formée. Des conclusions en sont tirées sur l'hypothèse d'un processus de polycondensation évoluant par une suite de réactions consécutives et compétitives.

L'étude cinétique de la polycondensation du glycolle avec l'acide pyroglutamique (cinétique de disparition des réactifs et cinétique d'apparition des produits) vérifie l'hypothèse émise sur le processus de polycondensation. L'ordre de la réaction est de 1 par rapport au glycolle et de 2 par rapport à l'acide pyroglutamique. Ces résultats montrent l'analogie de cette réaction avec celles de la polycondensation des diacides avec les diamines et les diols. L'ordre de la réaction étant de 1 par rapport aux diamines et diols et de 2 par rapport aux diacides. Ces réactions sont catalysées par les acides. L'acide pyroglutamique a donc un double rôle, un rôle d'initiateur par sa présence, et un rôle de catalyseur par la présence de son groupement carboxylique.

Les produits de condensation de l'acide aspartique sont d'un type particulier ; en effet, l'acide aspartique qui se condense facilement seul, donne des produits de condensation de poids moléculaire plus élevé et dont la structure est celle d'une polyimide qui s'hydrolyse facilement en milieu alcalin en acide polyaspartique.

Par comparaison avec les acides aminés acides (acide glutamique et acide aspartique) qui ont des comportements très différents quand ils sont chauffés, nous avons voulu préciser le comportement thermique des acides aminés basiques, sous leur forme base. La lysine base se polycondense facilement pour donner une polylysine de structure tridimensionnelle, avec des enchainements peptidiques impliquant le groupement  $\epsilon$ -aminé de la lysine en prédominance sur les enchainements impliquant le groupement  $\alpha$ aminé. L'ornithine base et l'acide  $\alpha,\gamma$ -diamino-

butyrique base se cyclisent par chauffage en leur lactame. Ces constatations sont en faveur d'un mécanisme de polycondensation de la lysine base qui 'morcerait aux dépens de la lactame de la lysine.

Les propriétés physiques et chimiques des polypeptides dont le poids moléculaire est le plus élevé (de l'ordre de 5.000) sont à la fois celles des protéines vraies (réaction du biuret typique, existence de bandes d'absorption en infrarouges propres à la liaison peptidique, existence d'un point isoélectrique) et celles de polycondensats préparés par voies chimiques (hétérogénéité en ultracentrifugation due à une certaine distribution pondérale des macromolécules, enchaînements au hasard des acides aminés).

Les propriétés biologiques au contraire sont assez inattendues. Les enzymes protéolytiques de la série des endopeptidases n'ont aucune action décelable sur les peptides les plus importants ; seule une exopeptidase comme la carboxypeptidase peut agir sur les peptides à alanine et à phénylalanine. Ce résultat confirme la structure des peptides du type Pyroglu-(Ala)<sub>n</sub>-OH et du type Pyroglu-(Phé)<sub>n</sub>-OH.

Aucun pouvoir antigénique de nos polypeptides n'a pu être mis en évidence par les méthodes d'immunisation et de détection que nous avons utilisées.

Cependant nous avons pu déterminer le pouvoir bactéricide de la polylysine sur plusieurs souches microbiennes. Cette action s'apparente aux propriétés bactéricides des antibiotiques naturels de type de la polymyxine ou synthétiques du type de la polyornithine.

-----

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) D.W. ADAMSON, J. Am. Chem. Soc., 1939, 61, 1564
- (2) R. AELION, Ann. Chim., 1948, 3, 5
- (3) R. AUDUBERT et S. DE MENDE, Les principes de l'électrophorèse - Presses universitaires de France 1957
- (4) C.H. BAMFORD, A. ELLIOTT et W.E. HANEY, Synthétique Polypeptides, Académic Press Inc. Publishers New-York 1956
- (5) A.F. BEECHAM, J. Am. Chem. Soc., 1954; 76, 4613
- (6) P.H. BELL et coll. J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 5051
- (7) G. BISERTE, Bull. Soc. Chem. Biol., 1957, 39, 661
- (8) G. BISERTE et M. DAUTREVAUX, Bull. Soc. Chem. Biol., 1957, 39, 795
- (9) G. BISERTE, J.W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE et P. SAUTIERE, J. Chromat., 1959, 2, 225
- (10) G. BISERTE, Th. PLAQUET - SCHOONAERT, P. BOULANGER et P. PAYSANT, J. Chromat., 1960, 3, 25
- (11) E.R. BLOUT et S.G. LINSLEY, J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 1946
- (12) G. CHAMPETIER, Traité de chimie organique par V. GRIGNARD Tome XXII, p. 563
- (13) C.A. DEKKER, J. Biol. Chem., 1949, 181, 719
- (14) A. ELLIOTT, Proc. Roy. Soc. A. 1953, 221, 104
- (15) A. ELLIOTT, Proc. Roy. Soc. A. 1954, 226, 408
- (16) A. ELLIOTT et E.R. MALCOLM, Trans. Faraday Soc. 1956, 52, 528
- (17) P.J. FLORY, J. Am. Chem. Soc. 1936, 58, 1877
- (18) S.W. FOX et K. HARADA, Science, 1958, 128, 1214
- (19) S.W. FOX, K. HARADA et A. VEGOTSKY, Expérientia, 1959, 15, 81
- (20) S.W. FOX et K. HARADA, J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 3745
- (21) S.W. FOX et K. HARADA, Arch. Biochem. Biophys., 1960, 86, 281
- (22) E. FRIEDMAN, T.J. GILL, P. DOTTY, J. Am. Chem. Soc. 1961, 83, 4050
- (23) N.I. GAVRILLOW, M.I. PLECHAN, N.A. PODOUBNAJA Bull. Acad. Sci. URSS. Cl. Sci. Chim. 1941, I, 127

- (24) T.J. GILL et P. DOTY, J. Mol. Biol. 1960, 2, 65
- (25) T.J. GILL et coll., J. Biol. Chem., 1961, 236, 2677
- (26) T.J. GILL, Biochem. Biophys. Acta, 1962, 56, 344
- (27) K. HARADA et S.W. FOX, J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 2694
- (28) K. HARADA, Bull. Chem. Soc. Japan, 1959, 32, 1007
- (29) K. HARADA et S.W. FOX, Arch. Biochem. Biophys., 1960, 86, 275
- (30) W. HAUSMAN, J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 3663
- (31) L. HILL et F. SMITH, J. Biol. Chem., 1957, 228, 578
- (32) E. KATCHALSKY et M. SELA, Advances in Protein Chemistry  
Academic Press Inc. Publishers, New-York, 1958,  
vol. XIII, p. 243
- (33) KOBER et SUGIURA, J. Biol. Chem., 1912, 13, 1
- (34) KOBER et HAM, J. Am. Chem. Soc., 1916, 38, 457
- (35) J. KOVACS, I. KONYES, A. PUSZTAI, Expérientia, 1953, 9, 459
- (36) H.G. MUNKEL et A. TISELIUS, J. of Gén. Physiol.  
1951, 35, 89
- (37) A.L. LEVY, Nature, 1954, 174, 126
- (38) M. MACHEBOEUF et coll., Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 34, 1543
- (39) P.H. MAURER et coll. J. Immunol., 1959, 83, 193
- (40) T. OHIRA, J. Agri. Chem. Soc. Japan. 1940, 16, 293
- (41) S.C. PAN et J.D. DUTCHER, Anal. Chem., 1956, 28, 836
- (42) H.N. RYDON et P.W.G. SMITH, Nature, 1952, 169, 922
- (43) F. SANGER, Biochem. J., 1945, 39, 507
- (44) F. SANGER, Biochem. J., 1949, 45, 562
- (45) C. SANDIE, Bull. Soc. Chem. France, 1942, 9, 487
- (46) SASAKI, Biochem. Z., 1921, 114, 63
- (47) J.C. SHEEHAN, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1067
- (48) J.C. SHEEHAN et H. YANG, J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 1154
- (49) D.H. SPACKMAN, E.L. SMITH et D.M. BROWN, J. Biol. Chem.,  
1955, 212, 255
- (50) M.A. STAHMANN, J.S. FRUTON, M. BERGMANN, J. Biol. Chem.  
1946, 164, 753
- (51) M.A. STAHMANN, D.J. BUCHANAN, DAVIDSON, Nature, 1959, 184, 549

- (52) A. TISELIUS et P. FLODIN, Advances in Protein Chemistry  
1953, 8, 461
- (53) A. VEGOTSKY, K. HARADA et S.W. FOX, J. Am. Chem. Soc.  
1958, 80, 3361
- (54) M. VIGNERON, Ann. Pharm. France, 1960, 18, 404
- (55) E. WILSON et R.K. CANNAN, J. Biol. Chem. , 1937, 119, 309
- (56) G. KRAMPITZ et F. KNAPPEN, Nature, 1962, 195, 385.

## TABLE DES MATIERES

-----

	pages
<u>INTRODUCTION</u>	I
<u>CHAPITRE I</u>	
TECHNIQUES GENERALES	
A) Préparation de l'acide pyroglutamique	3
B) Méthodes de condensation	4
1 <sup>o</sup> ) Procédé de FOX et HARADA	
2 <sup>o</sup> ) Technique personnelle	
C) Techniques analytiques	6
1 <sup>o</sup> ) Méthodes de séparation des acides aminés et des peptides	
2 <sup>o</sup> ) Méthodes de révélation spécifique	
3 <sup>o</sup> ) Dosages	
<u>CHAPITRE II.-</u>	
INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LA CONDENSATION DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE et DES AMINOACIDES.	
A) Influence de la température	IO
B) Influence de la durée de condensation	II
C) Influence du rapport initial $\frac{\text{acide aminé}}{\text{ac.pyroglutamique}}$	II
<u>CHAPITRE III.-</u>	
STRUCTURE DES PRODUITS DE CONDENSATION	
A) Structure et composition des produits de condensation du glyocolle	15
1 <sup>o</sup> ) Etude de la fraction soluble	15
a) Séparation des produits de condensation	
b) composition et structure chimiques des produits A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , ... A <sub>7</sub> .	

2°) Etude de la fraction insoluble	17
a) Composition en amino acides	
b) dosage des COOH-terminaux	
c) détermination des acides aminés en position N-terminale	
d) détermination des acides aminés en position C-terminale	
e) Etude de l'hydrolysat partiel acide	
B) Etude des produits de condensation de l'alanine	23
1°) aminoacide en position C-terminale	
2°) Etude de l'hydrolysat partiel acide	
C) Structure des produits de condensation du monochlorhydrate de lysine	26
D) Structure des produits de condensation de la tyrosine	3I
E) Structure des produits de condensation de la phénylalanine	3I
F) Structure des produits de condensation de l'acide aspartique	3I
1°) Condensation de l'acide aspartique avec l'acide pyroglutamique	
2°) Condensation de l'acide aspartique et de la tyrosine en présence d'acide pyroglutamique	
3°) Condensation de l'acide aspartique et du monochlorhydrate de lysine en présence d'acide pyroglutamique.	
4°) Condensation de l'acide aspartique, du monochlorhydrate de lysine et de la tyrosine, en présence d'acide pyroglutamique	
G) Récapitulation	38
H) Conclusion	40
<b><u>CHAPITRE IV.- CINETIQUE</u></b>	
A) Introduction	4I
B) Vérification cinétique de l'hypothèse émise sur le processus de polycondensation.	43
C) Etude théorique de la cinétique de la réaction	45

D) Cinétique d'apparition des peptides	47
E) Cinétique de disparition du glycocolle	49
F) Vérification de la constance du rapport	
$k = \frac{V_0 V_0}{k_0^2 B_0}$	51
G) Discussion	52
H) Conclusion	

#### CHAPITRE V.-

##### CONDENSATION THERMIQUE DES ACIDES AMINES BASIQUES SOUS LEUR FORME BASE

INTRODUCTION	54
A) Condensation de la lysine base	54
B) Condensation de l'ornithine base	56
C) Condensation de l'acide diaminobutyrique	58

#### CHAPITRE VI.-

##### PROPRIETES PHYSIQUES, CHIMIQUES et BIOLOGIQUES

A) Caractère de solubilité	60
B) Spectre d'absorption des réactions du biuret	60
C) Poids moléculaire	61
D) Point isoélectrique	66
E) Spectres infra-rouge	68
F) Comportement vis à vis des enzymes protéolytiques	70
G) Pouvoir bactéricide des polylysines	71
H) Pouvoir antigénique	72
CONCLUSION	73

FIGURE 1.-

Séparation électrochromatographique (pH 3,9-Butanol/acétique) des produits de condensation thermique de l'acide glutamique sur lui-même, formés au cours de la synthèse de l'acide pyroglutamique.

FIGURE 2.-

Courbe expérimentale de titration du Glycocolle par potentiométrie en milieu non aqueux, au moyen d'une solution acétique d'acide perchlorique décimormale.

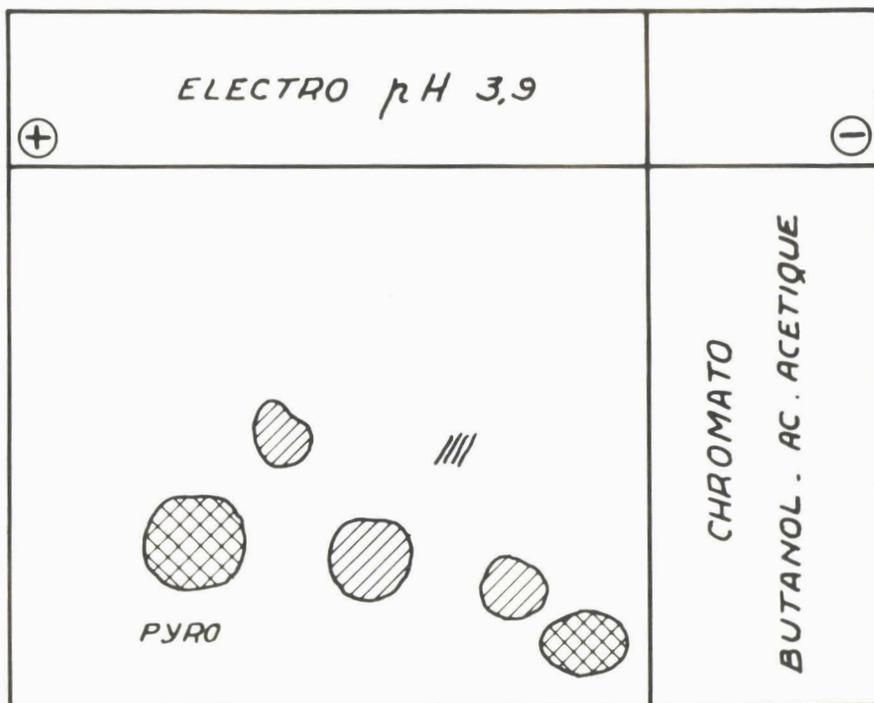


FIGURE 1

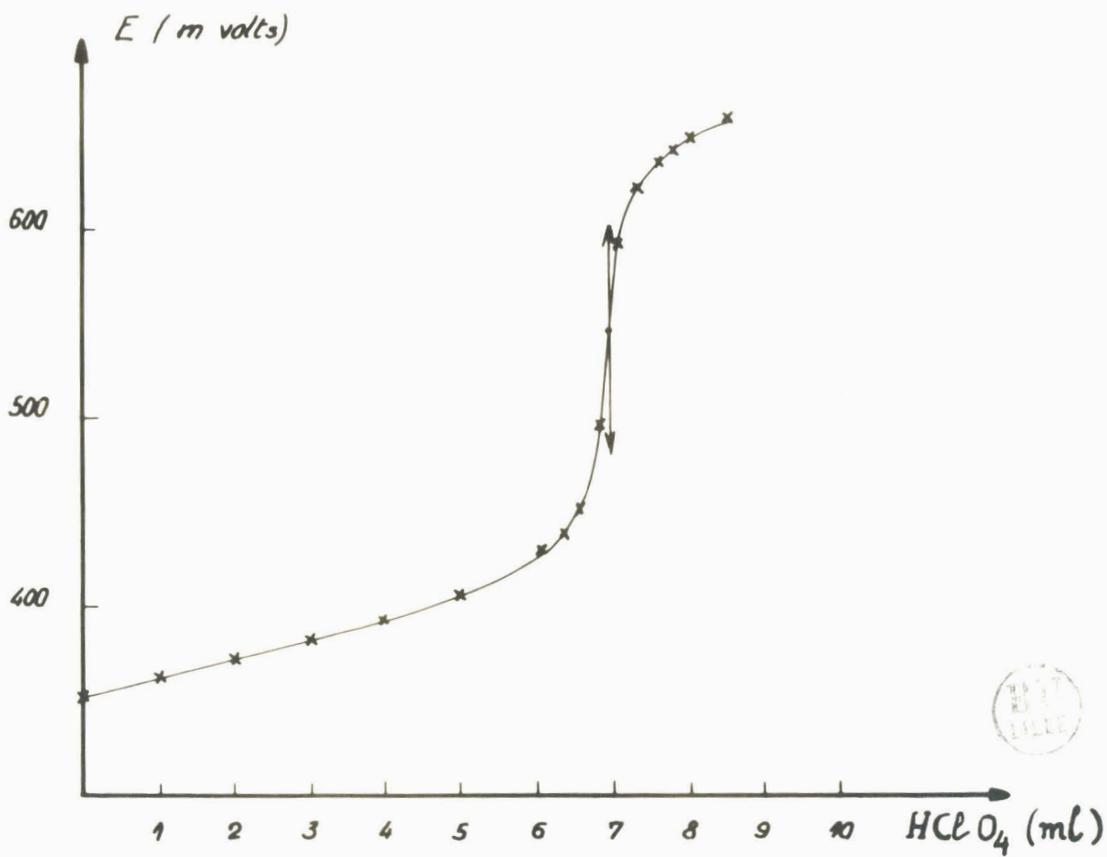


FIGURE 2



FIGURE 3.-

Séparation électrophorétique à pH 3,9 des acides aminés : acide aspartique, acide glutamique, acides aminés "neutres", acides aminés "basiques".

FIGURE 4.-

Couplage bidimensionnel de l'électrophorèse à pH 3,9 et de la chromatographie dans le système n-butanol/acide acétique/eau : 4 : 1 : 5.

FIGURE 5.-

Couplage bidimensionnel de l'électrophorèse à pH 2,4 et de la chromatographie dans le système n-butanol/acide acétique/eau : 4 : 1 : 5.

FIGURE 6.-

Séparation électrophorétique à pH 11 (ammoniaque N) des acides aminés basiques.

FIGURE 7.-

Repérage de peptides après électrophorèse à pH 3,9 à l'aide de témoins latéraux.

FIGURE 8.-

Système d'élution des bandelettes de papier contenant les peptides.

ELECTRO pH 3.9

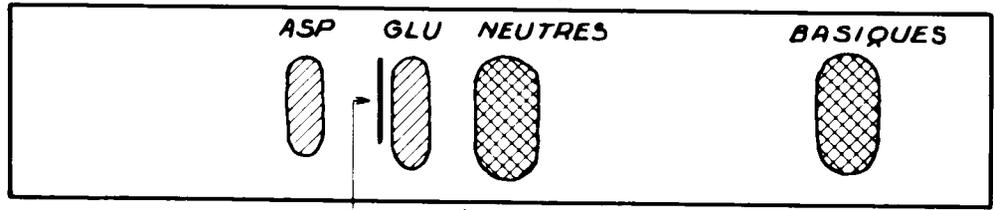


FIGURE 3

mélange  
d'Amino. Acides

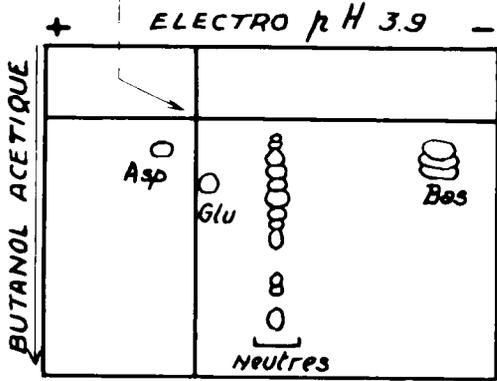


FIGURE 4

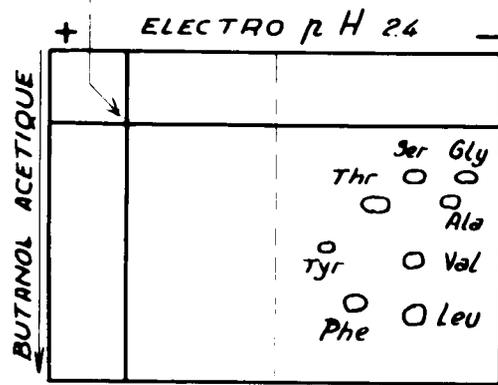


FIGURE 5

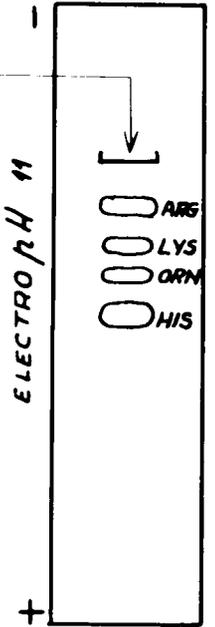


FIGURE 6

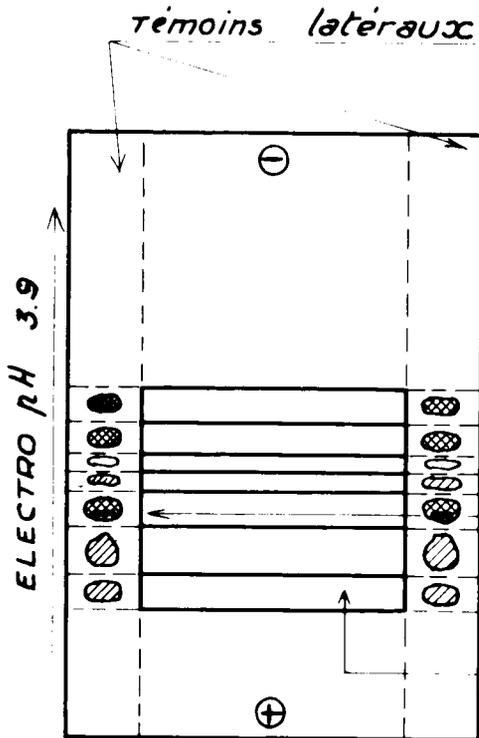
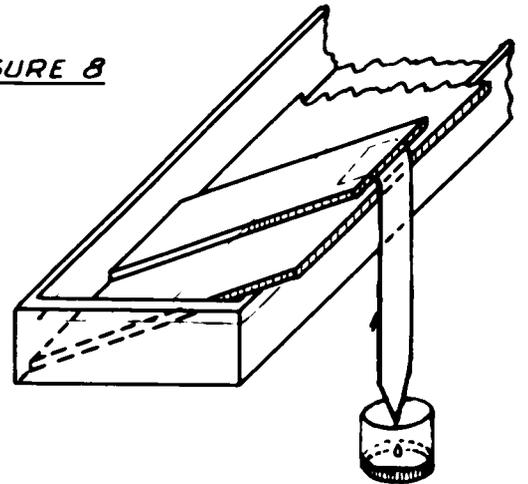


FIGURE 7

FIGURE 8



Ligne de  
dépôt  
Bande à éluer



FIGURE 9.-

Appareillage utilisé pour la synthèse des  
Dinitrophényl-amino-acides (DNP-Amino-acides).

FIGURE 10.-

Courbe cinétique de consommation de soude au cours  
de la dinitrophénylation. Cette courbe qui est  
construite automatiquement permet de voir la fin  
de la réaction.

FIGURE 11.-

Schéma de la cuve utilisée pour la chromatographie  
ascendante des DNP amino acides.

Solvant utilisé : Toluène/Pyridine/monochlo-  
rhydrique du glycol/ammoniaque : 30 : 9 : 18 : 18.

FIGURE 12.-

Carte chromatographique bidimensionnelle des DNP  
amino acides éthersolubles dans les deux solvants  
suivants :

- première dimension : chromatographie ascendante  
dans le système Toluène/pyridine/monochlorhydrique  
du glycol/ammoniaque : 30 : 9 : 18 : 18.
- Deuxième dimension : tampon phosphate 1,5 M de pH6

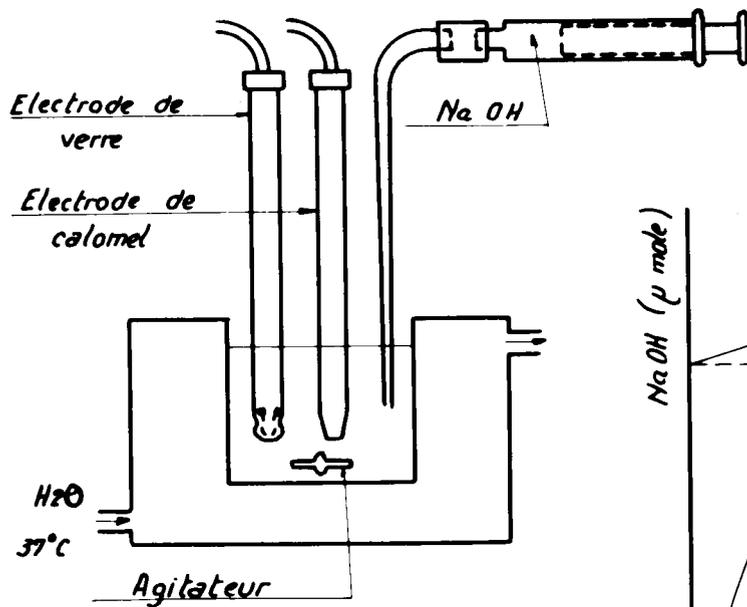


FIGURE 9

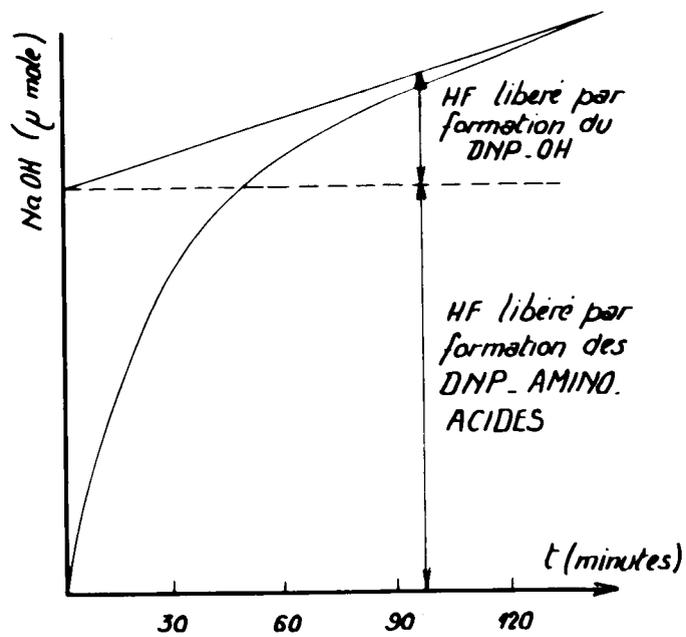


FIGURE 10

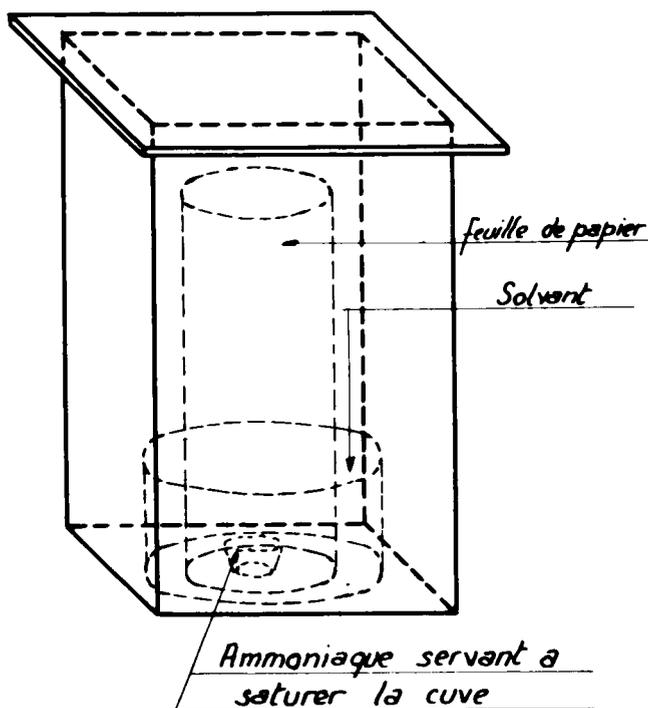


FIGURE 11

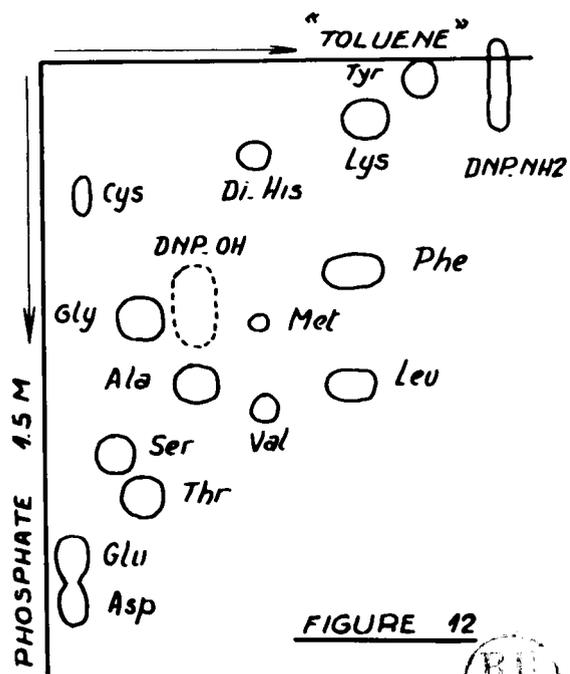


FIGURE 12



FIGURE I3.-

Variation de la densité optique du biuret en fonction du temps, pour 3 températures différentes : 150°C, 170°C, 190°C. (La densité optique est donnée pour une concentration de 1 mg de peptide par ml).

FIGURE I4.-

Variation de  $-\log V_0$  en fonction de  $\frac{1}{T}$

$V_0$  = pente au temps  $t_0$  des courbes de la figure I3 ;

$V_0$  exprime la vitesse initiale d'apparition des peptides.

$T$  = Température absolue à laquelle la réaction a été faite.

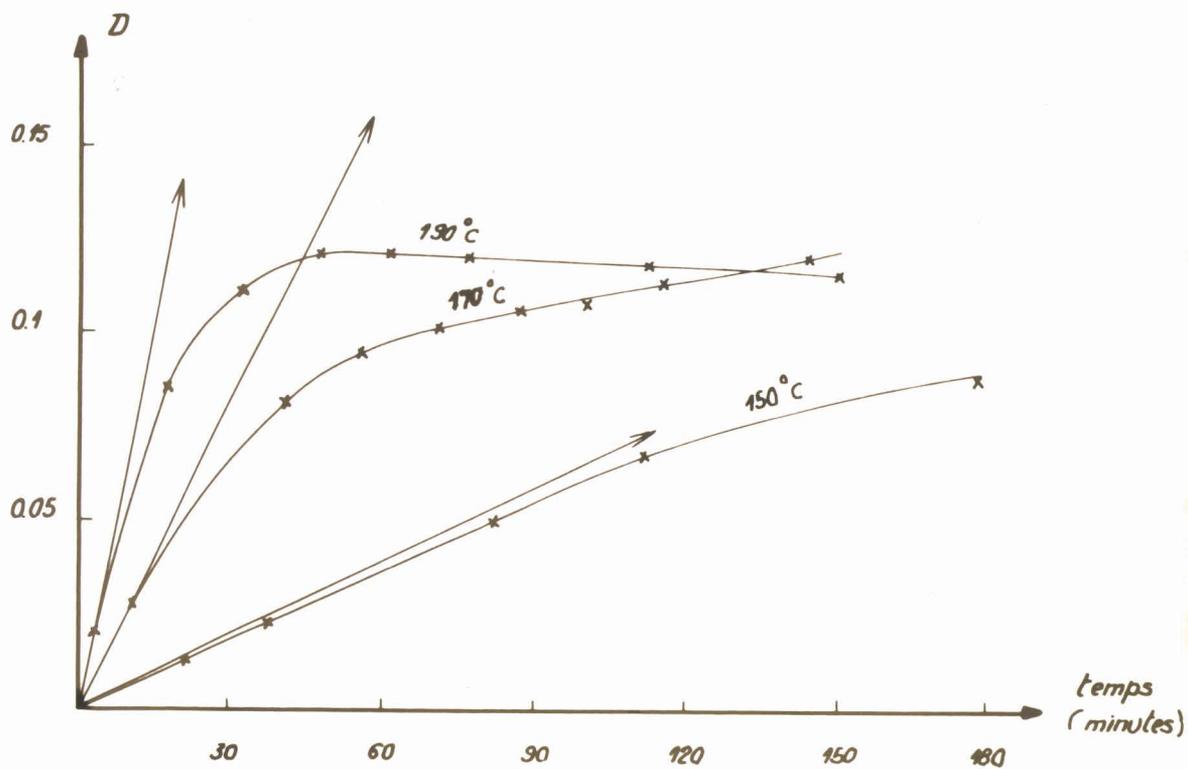


FIGURE 13

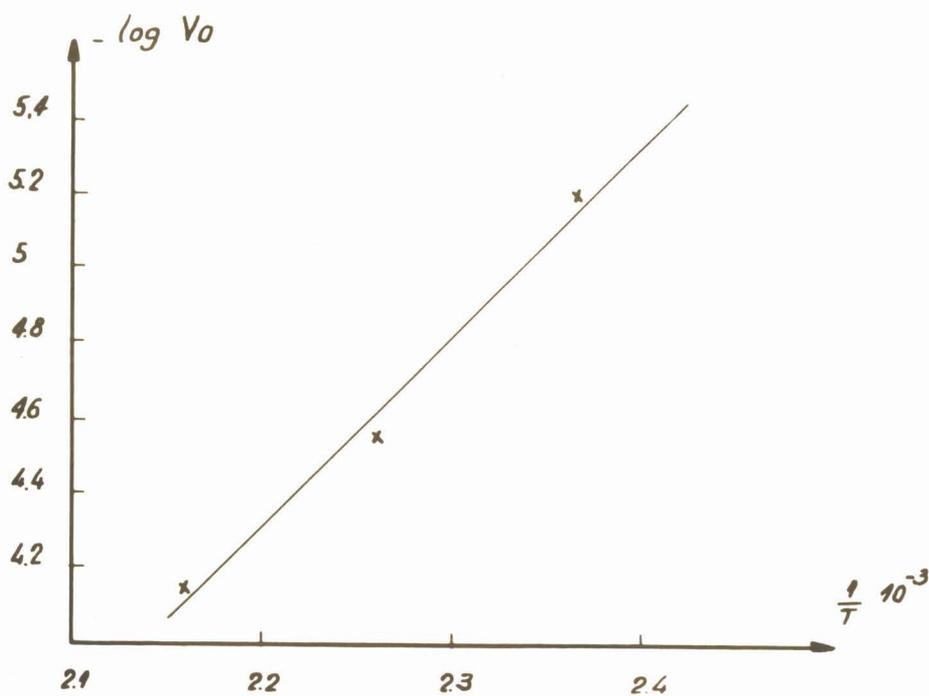


FIGURE 14



FIGURE I5.-

Variation du rendement (\*) en fonction de la  
Température, des produits insolubles obtenus par  
chauffage pendant 75 minutes d'un mélange d'acide  
pyroglutamique et de glycocolle ( $\frac{\text{glycocolle}}{\text{ac. pyroglutamique}} = 3$ )

FIGURE I6.-

Variation du rendement en fonction du temps, des  
produits insolubles obtenus par chauffage à 165°C  
d'un mélange d'acide pyroglutamique et de glycocolle  
( $\frac{\text{glycocolle}}{\text{ac. pyroglutamique}} = 3$ ).

FIGURE I7.-

Variation de la densité optique du biuret en  
fonction du temps, pour différents mélanges d'acide  
pyroglutamique et de glycocolle  
( $\frac{\text{glycocolle}}{\text{ac. pyroglutamique}} = 1, 2, 3, 5$ ).

La densité optique est donnée pour une concentra-  
tion de 1 mg de peptide par ml.

(\*) Le rendement est calculé en faisant le rapport du poids de  
la fraction insoluble dans l'eau sur le poids du mélange  
initial.

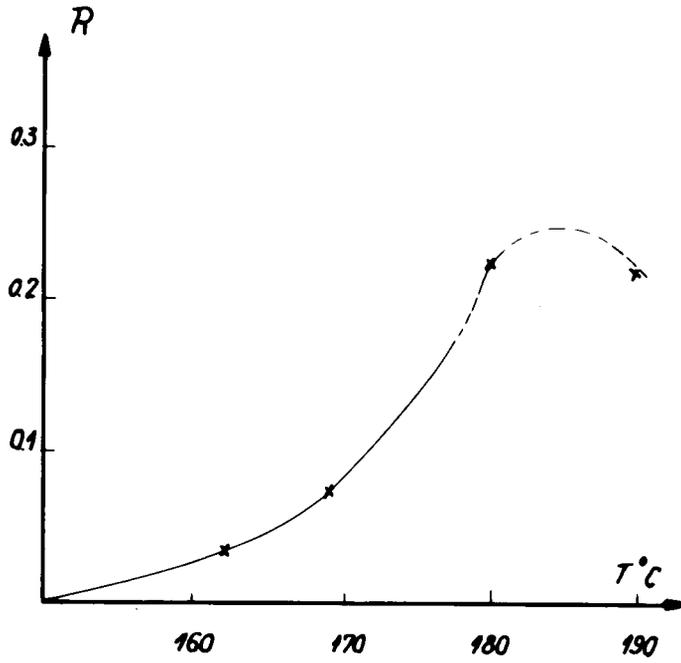


FIGURE 15

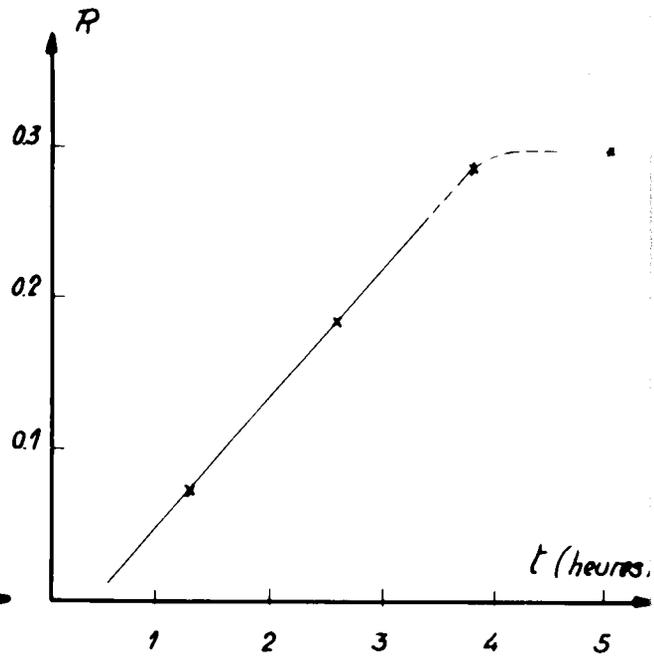


FIGURE 16

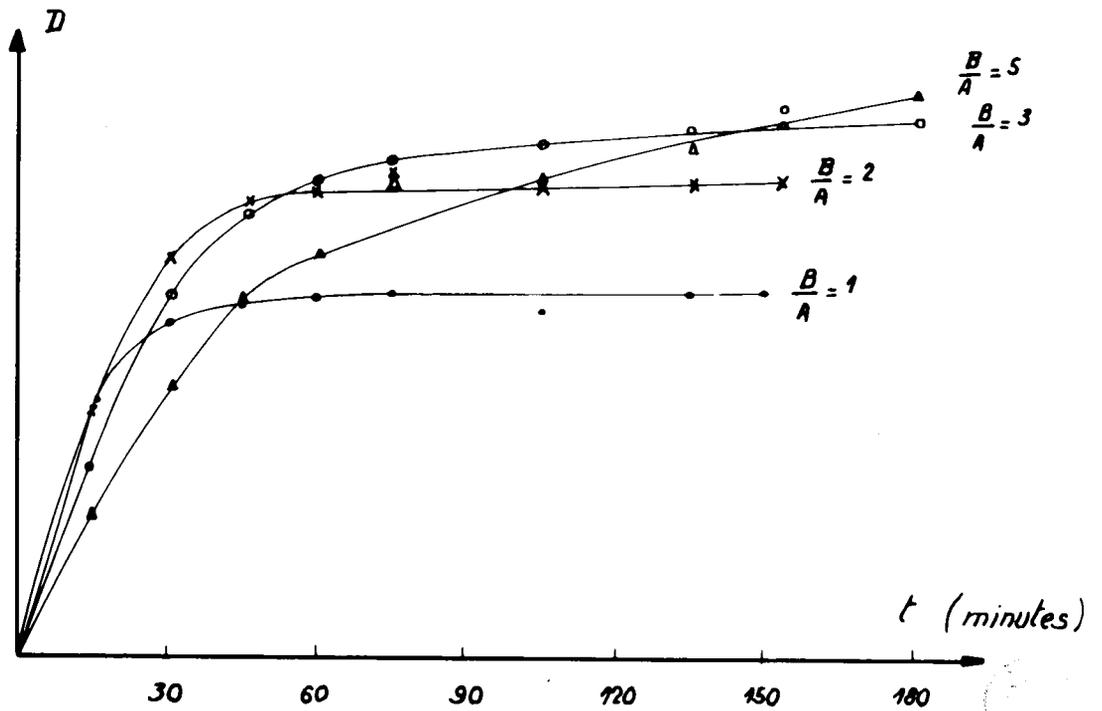


FIGURE 17

FIGURE 18.-

Séparation en électrophorèse à pH 3,9 des produits de condensation de l'acide pyroglutamique et du monochlorhydrate de lysine (  $\frac{\text{lysine}}{\text{ac. pyroglutamique}} = 1$  ) obtenus à 165°C, après différents temps de chauffage ( $\frac{1}{4}$  heure, 1h., 10h., et 48h.).



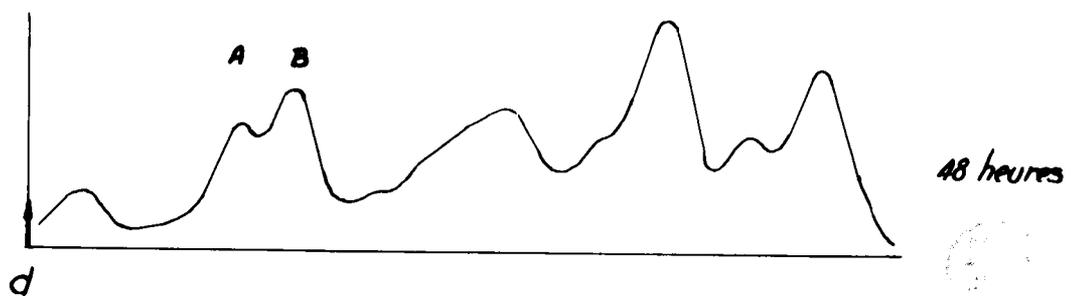
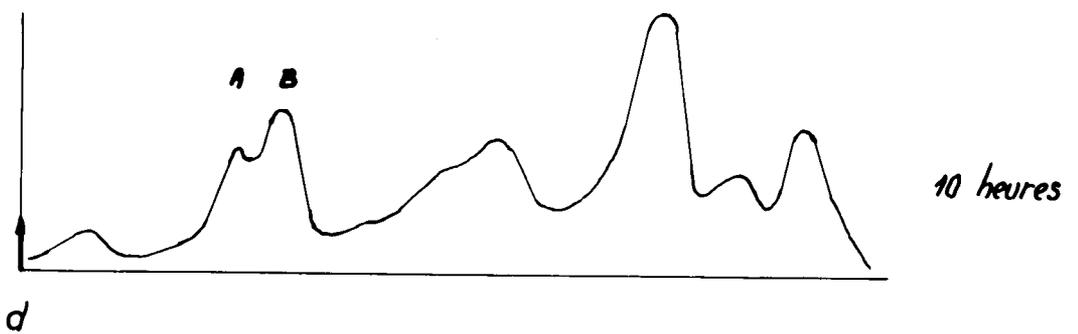
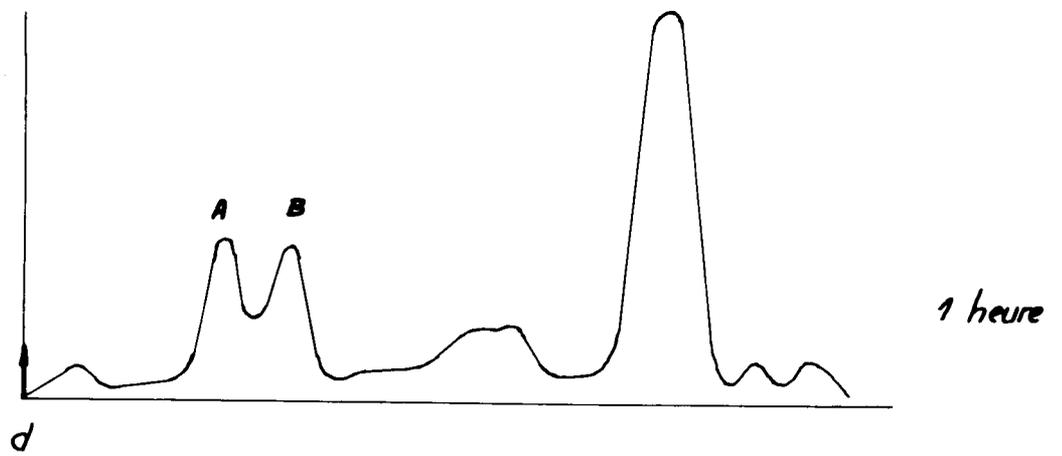
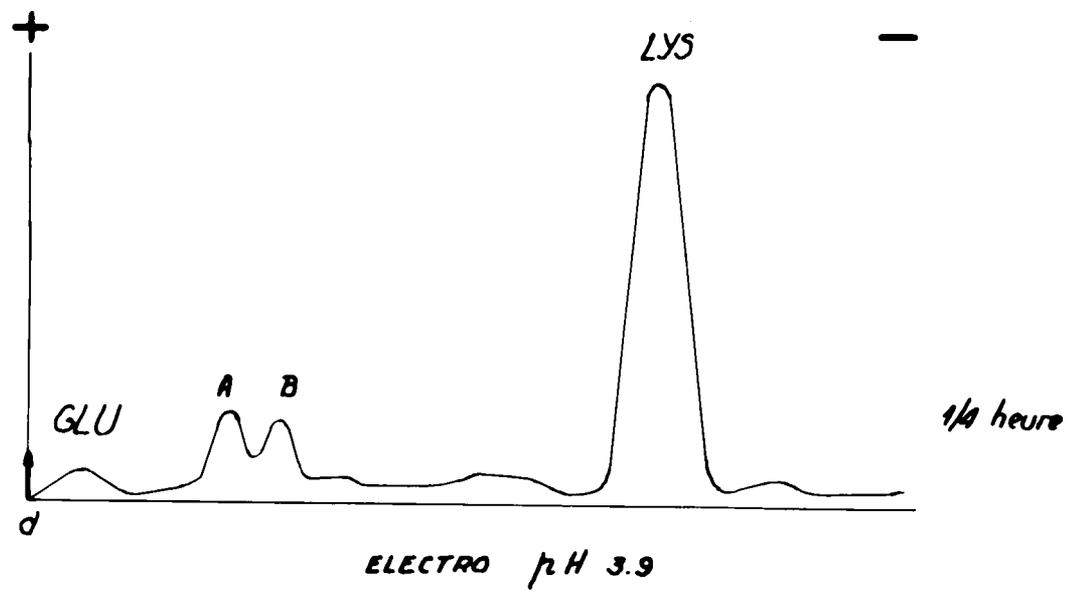


FIGURE 18

FIGURE 19.-

Variation de la densité optique du biuret en fonction du rapport  $\frac{B}{A}$  (\*) après 75 minutes de réaction. La densité optique est exprimée pour une concentration de 1 mg de peptide par ml.

FIGURE 20.-

Variation de la densité optique du biuret en fonction du rapport  $\frac{B}{A}$  (\*) après 75 minutes de réaction. La densité optique est exprimée pour une concentration identique en acide pyroglutamique pour chaque mélange ( $10^{-5}$  mole par ml).

FIGURE 21.-

Variation du rendement (\*\*) en peptides insolubles en fonction du rapport initial  $\frac{B}{A}$  (\*) pour deux temps de chauffage différents : 75 minutes et 150 minutes (Température de chauffage : 168°-170°C).

FIGURE 22.-

Variation du poids de la fraction peptidique insoluble (exprimée en g) en fonction du rapport initial  $\frac{B}{A}$  (\*) pour des mélanges contenant la même quantité d'acide pyroglutamique ( $10^{-2}$  mole).

(\*) - Le rapport  $\frac{B}{A}$  est égal au rapport molaire

$$\frac{\text{Glycocolle}}{\text{ac. pyroglutamique}}$$

(\*\*) - Le rendement est exprimé en faisant le rapport du poids de la fraction insoluble sur le poids du mélange initial.

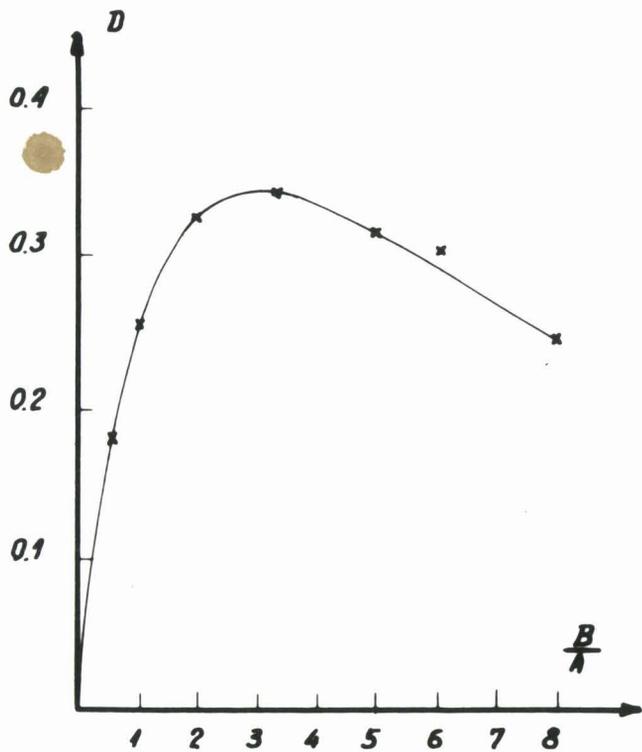


FIGURE 19

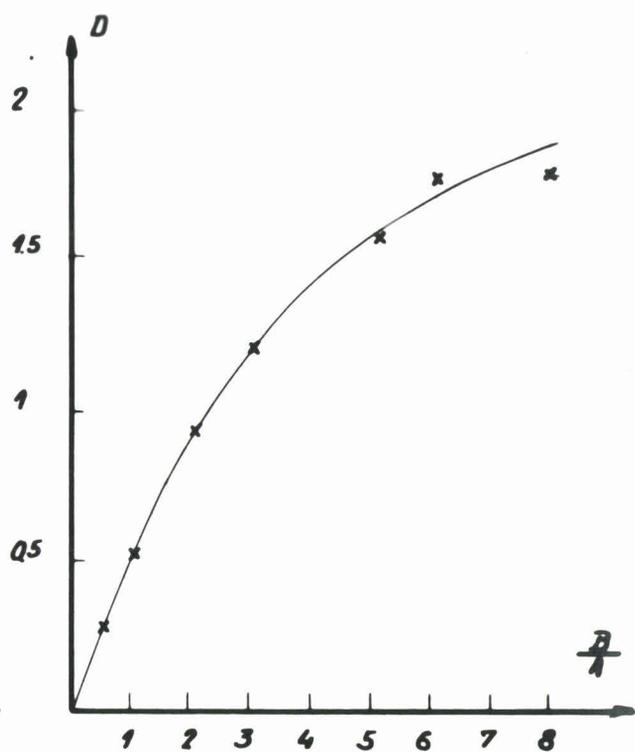


FIGURE 20

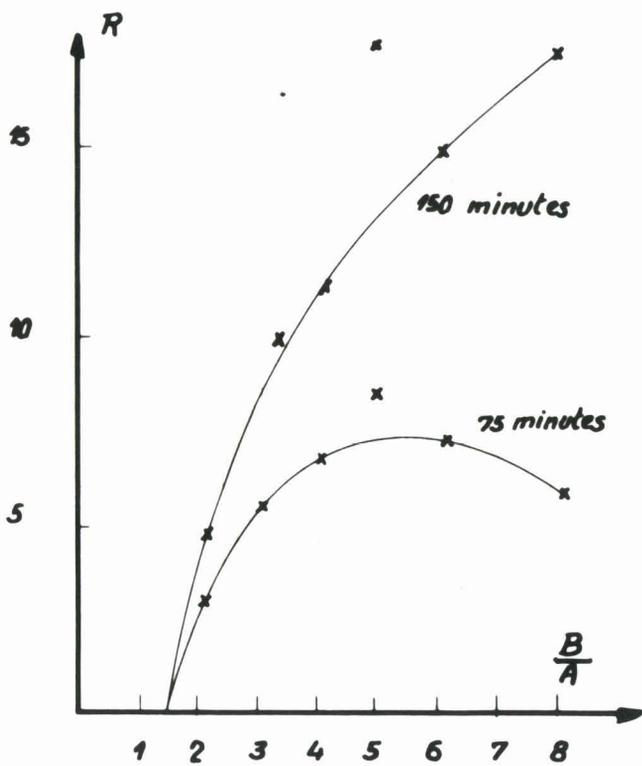


FIGURE 21

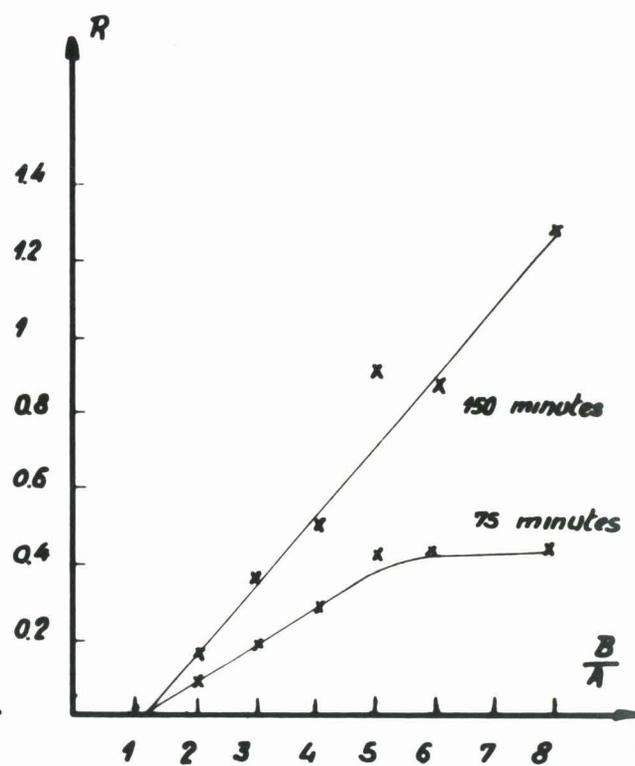


FIGURE 22



FIGURE 23.-

Séparation électrochromatographique des produits de condensation du glycocolle et de l'acide pyroglutamique. (\*)

FIGURE 24.-

Séparation électrochromatographique des produits de condensation de l'acide pyroglutamique et du dipeptide glycyl-glycine. (\*)

FIGURE 25.-

Séparation électrochromatographique des produits de condensation de l'acide pyroglutamique et du tripeptide glycyl-glycyl-glycine. (\*)

FIGURE 26.-

Séparation électrochromatographique des produits de condensation du pyroglutamyl-glycine de synthèse avec le dipeptide glycyl-glycine. (\*)

FIGURE 27.-

Séparation électrochromatographique des produits de condensation du pyroglutamyl-glycine de synthèse avec le tripeptide glycyl-glycyl-glycine. (\*)

(\*) Révélation par la réaction de PAN et DUTCHER.

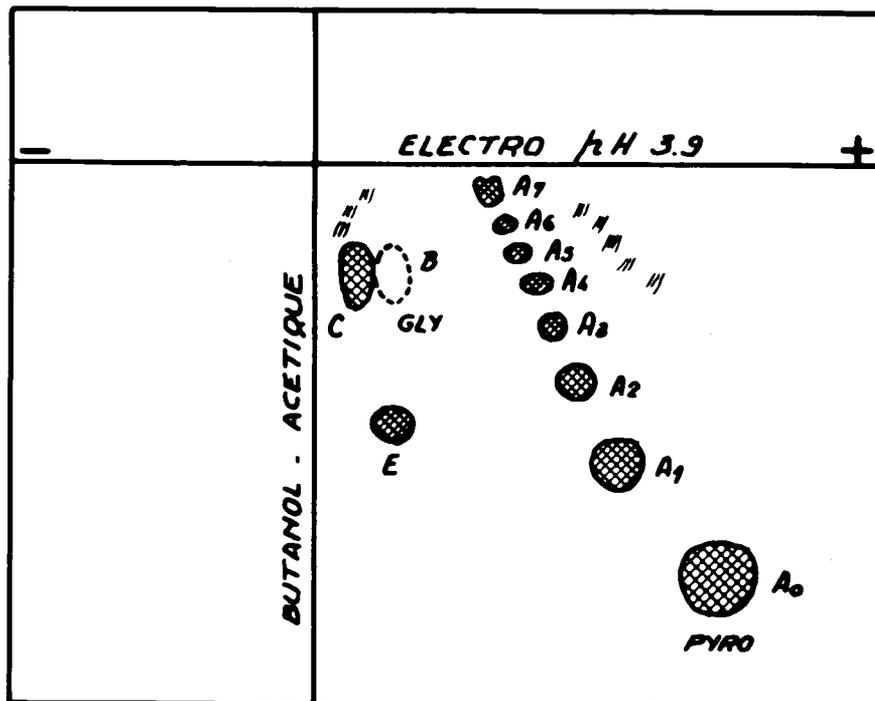


FIGURE 23

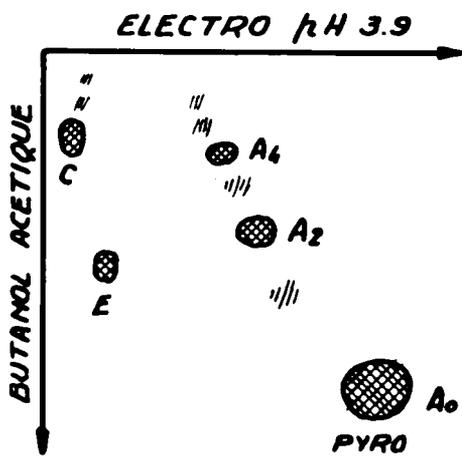


FIGURE 24

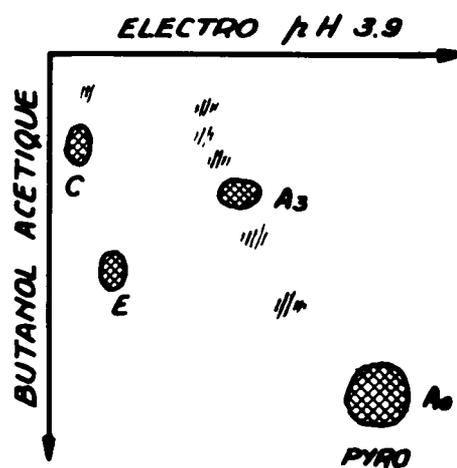


FIGURE 25

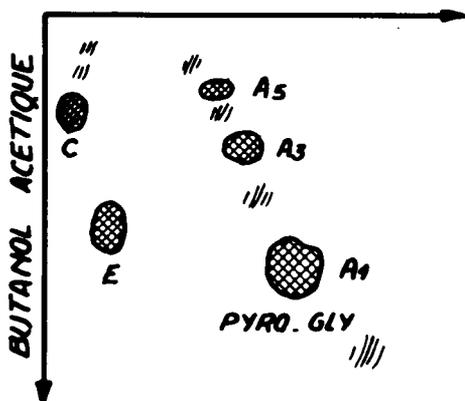


FIGURE 26

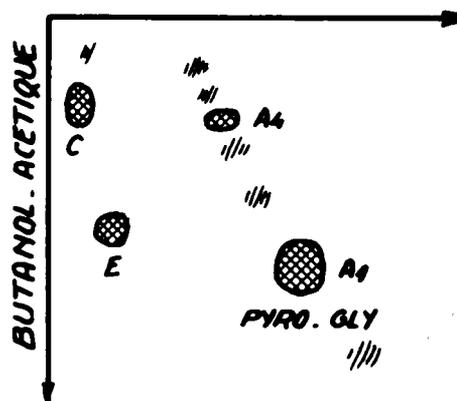


FIGURE 27

FIGURE 28.-

Identification par électrophorèse du pyroglutamyl-glycine de synthèse

A = pyroglutamyl-glycinate d'éthyle

B = pyroglutamyl-glycine

C = produits de condensation de l'acide pyroglutamique et du glyco-colle

Révélation par la réaction de PAN et DUTCHER.

FIGURE 29.-

Identification par chromatographie du pyroglutamyl-glycine de synthèse

A = pyroglutamyl-glycinate d'éthyle

B = pyroglutamyl-glycine

C = produits de condensation de l'acide pyroglutamique et du glyco-colle

FIGURE 30.-

Cinétique d'hydrolyse partielle acide des produits de condensation du glyco-colle (fraction insoluble dans l'eau).

Séparation par électrophorèse à pH 3,9

Révélation par la ninhydrine.

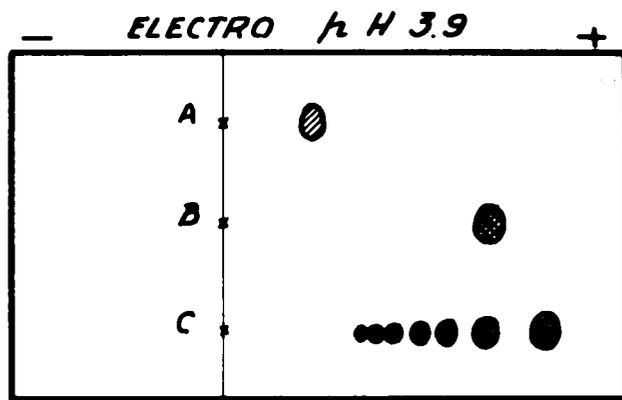


FIGURE 28

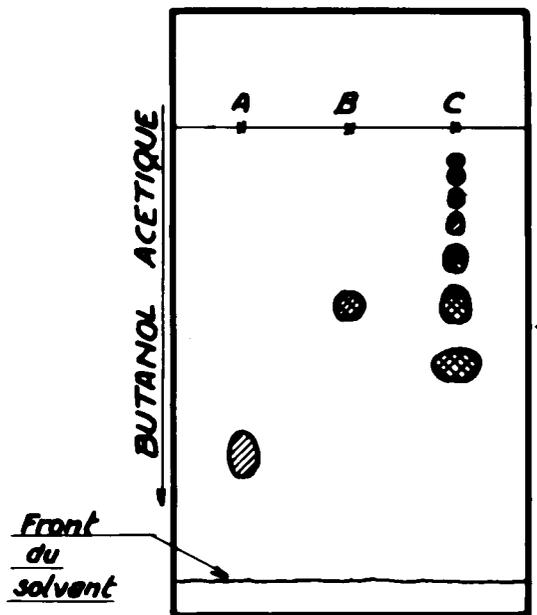


FIGURE 29

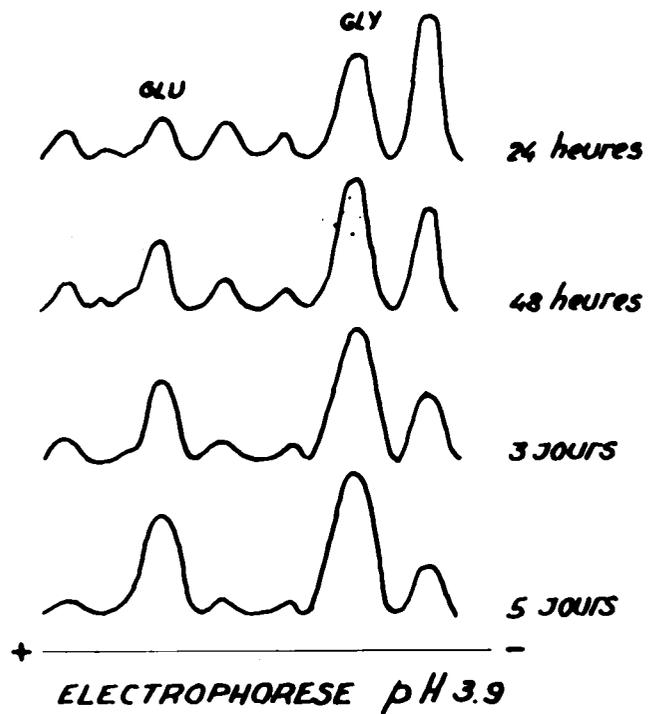


FIGURE 30

FIGURE 31.-

Séparation électrochromatographique de l'hydrolysât partiel acide des produits de condensation du glycocolle (fraction insoluble dans l'eau).  
Révélation par la ninhydrine.

FIGURE 32.-

Séparation électrochromatographique de l'hydrolysât partiel acide des produits de condensation de l'alanine.  
Révélation par la ninhydrine.

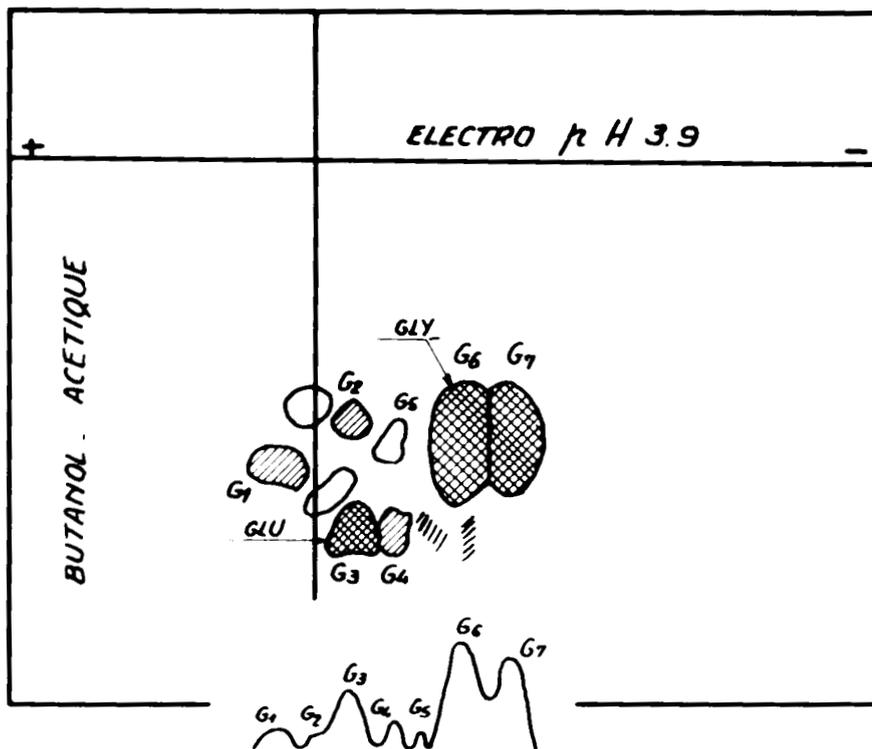


FIGURE 31

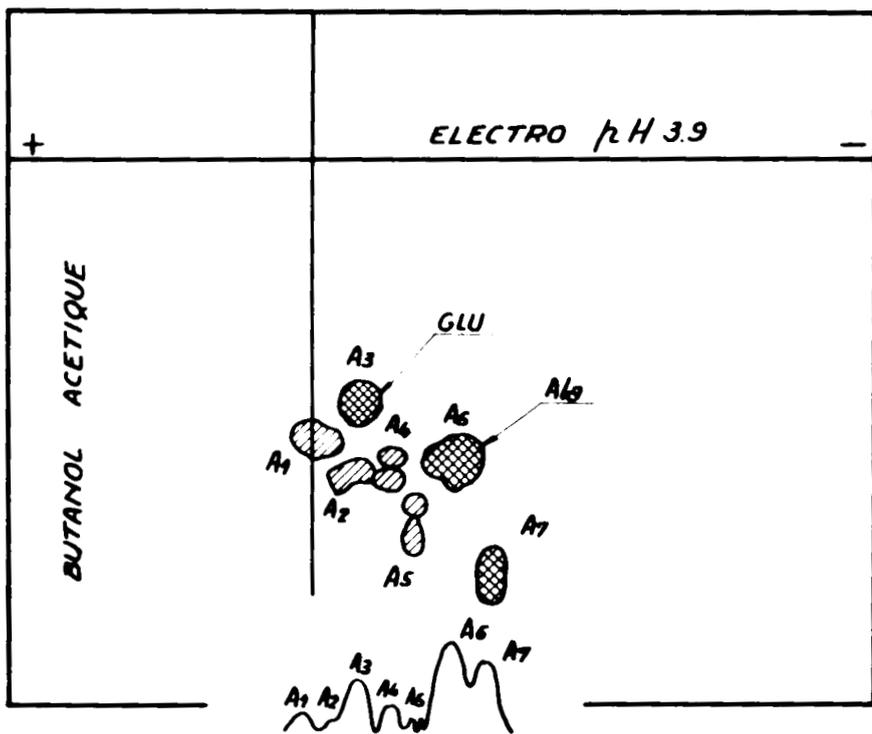


FIGURE 32

FIGURE 33.-

Identification de l'acide aminé en position  
N-terminale du peptide G4

FIGURE 34.-

Identification de l'acide aminé en position  
N-terminale du peptide G1

FIGURE 35.-

Identification des acides aminés en position  
N-terminale des peptides A2

FIGURE 36.-

Identification des acides aminés en position  
N-terminale des peptides A5

FIGURE 37.-

Identification des acides aminés non dinitrophé-  
nylés des peptides G4, G1, G2 et G3.  
Révélation par la ninhydrine.

FIGURE 38.-

Identification des peptides à glycolle obtenus  
par hydrolyse partielle acide des polyglycolles.  
Séparation par électrophorèse à pH 2,4  
Révélation par la ninhydrine.

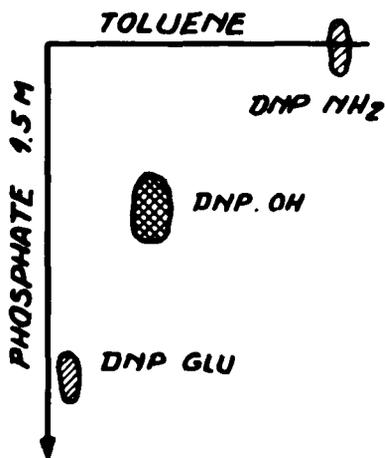


FIGURE 33

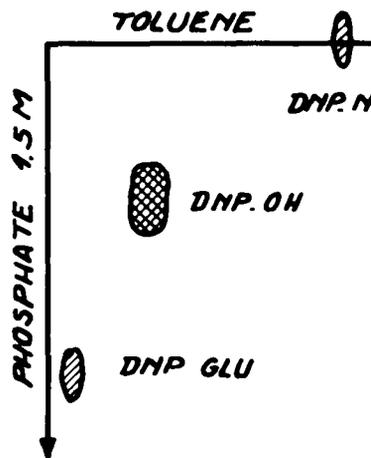


FIGURE 34

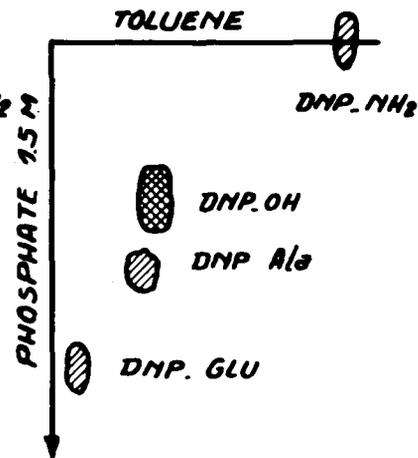


FIGURE 35

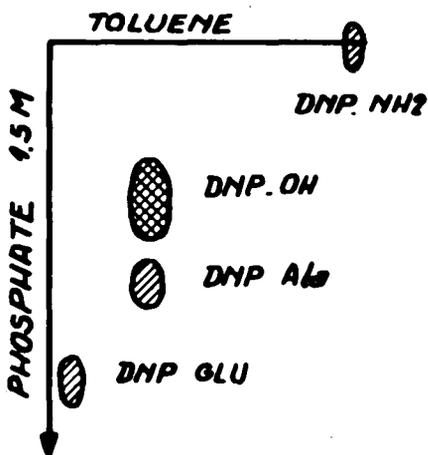


FIGURE 36

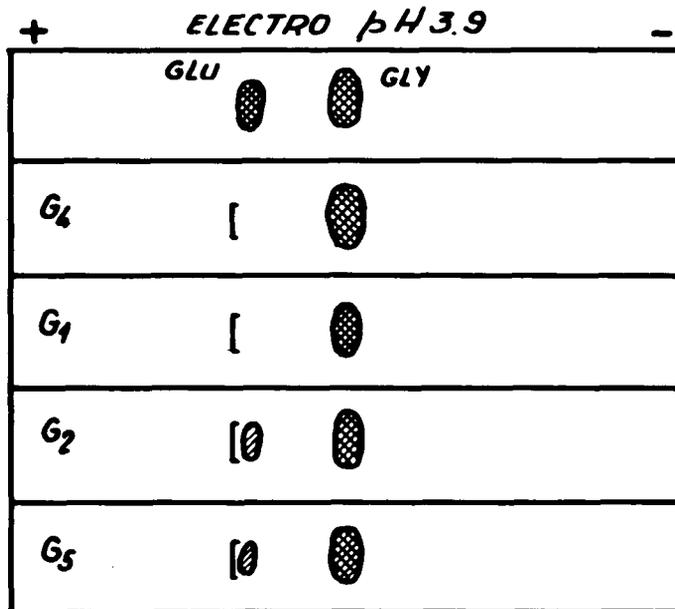


FIGURE 37

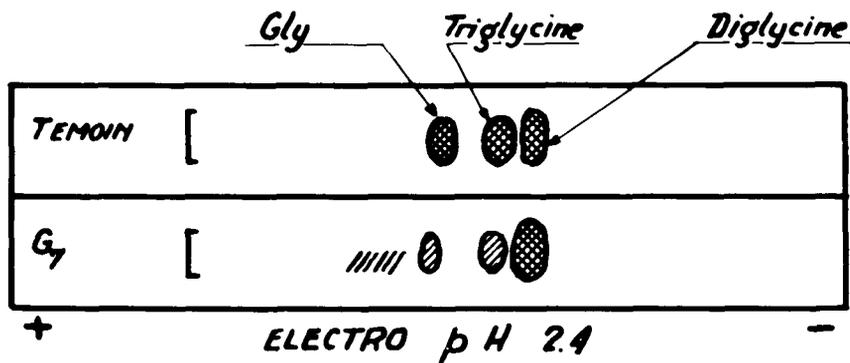


FIGURE 38

FIGURE 39.-

Séparation électrochromatographique des produits de condensation de l'acide pyroglutamique et du monochlorhydrate de lysine (rapport  $\frac{1}{1}$ )  
Révélation par la ninhydrine.

FIGURE 40.-

Séparation électrochromatographique des produits de condensation de l'acide pyroglutamique et du monochlorhydrate de lysine (rapport  $\frac{1}{1}$ )  
Révélation par la réaction de PAN et DUTCHER.

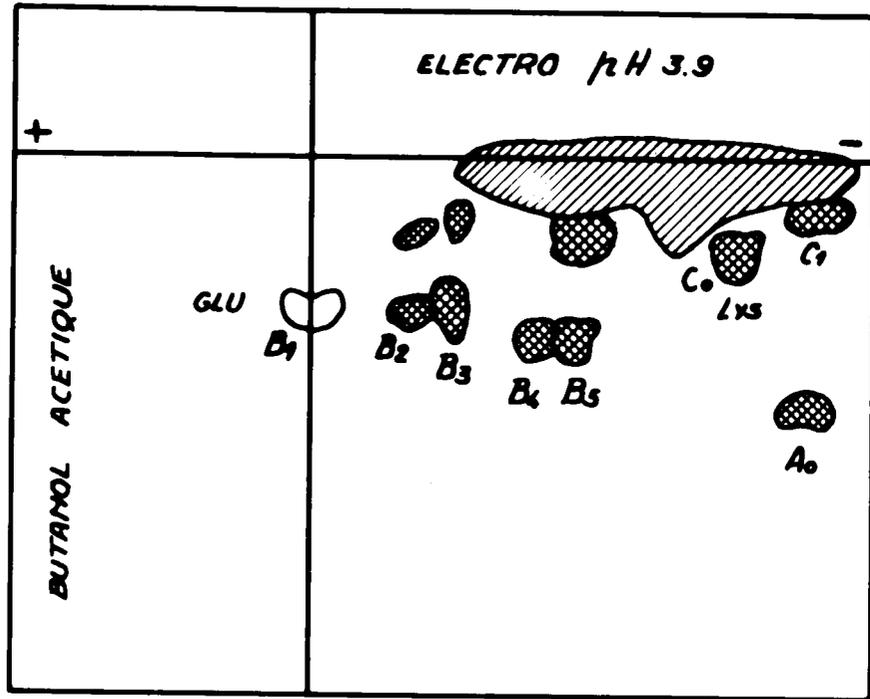


FIGURE 39

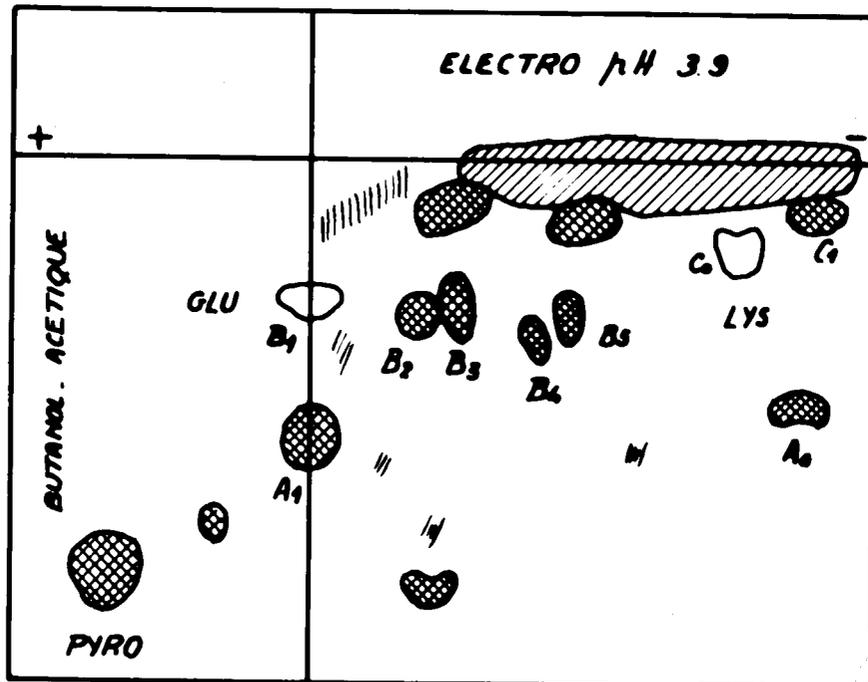


FIGURE 40

FIGURE 41.-

Séparation électrophorétique de l'hydrolysats  
total du peptide A1

FIGURE 42.-

Séparation électrophorétique de l'hydrolysats  
total du peptide B2, avant dinitrophénylation  
et après dinitrophénylation.

FIGURE 43.-

Séparation électrophorétique de l'hydrolysats  
total du peptide B3, avant dinitrophénylation  
et après dinitrophénylation.

FIGURE 44.-

Séparation électrophorétique de l'hydrolysats  
total du peptide B4 avant dinitrophénylation  
et après dinitrophénylation.

FIGURE 45.-

Identification de l'acide aminé constitutif  
au peptide C1

FIGURE 46.-

Séparation électrophorétique des mono-DNP-lysines  
obtenus après hydrolyse totale des DNP-peptides  
B2, B3, B4 et C1.



FIGURE 41

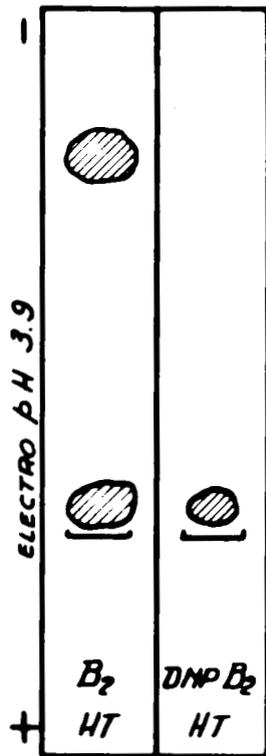


FIGURE 42

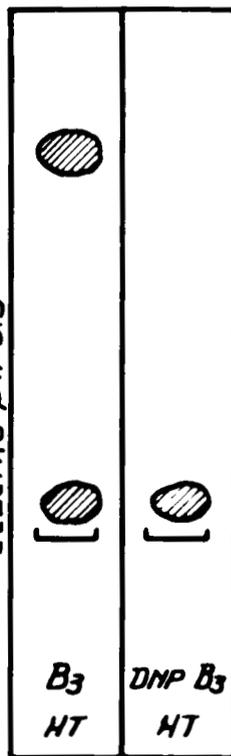


FIGURE 43

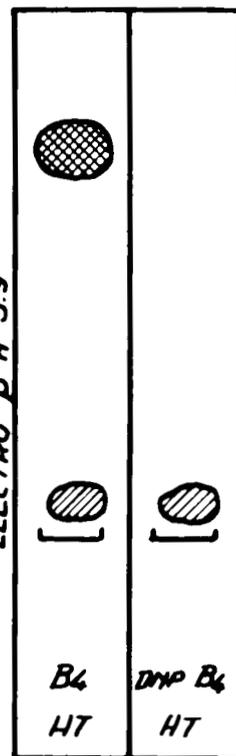


FIGURE 44



FIGURE 45

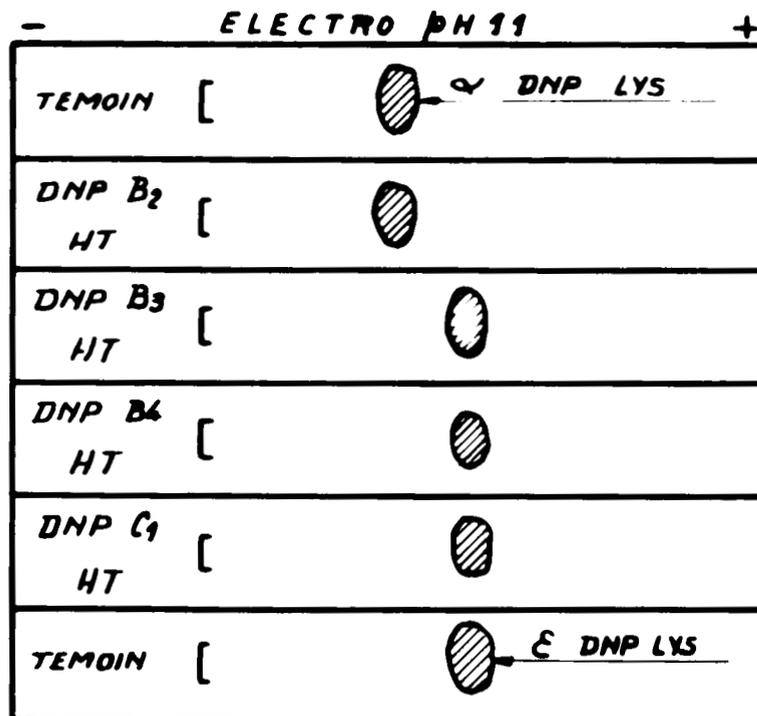


FIGURE 46

FIGURE 47.-

Séparation électrophorétique des produits de condensation de l'acide pyroglutamique et de la tyrosine (rapport 1/1)

- a) révélation par la ninhydrine
- b) révélation par l'  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphtol

FIGURE 48.-

Séparation électrophorétique des produits de condensation de l'acide pyroglutamique, de l'acide aspartique et de la tyrosine (rapports 2/1/1)

- a) révélation par la ninhydrine
- b) révélation par l'  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphtol.

FIGURE 49.-

Cinétique d'hydrolyse alcaline (pH 8,5) d'un échantillon de 20 mg de polyaspartique (structure polyimide) dissout dans 20 ml d'urée IOM.

- (1) courbe expérimentale
- (2) consommation de soude par la solution d'urée IOM. à pH 8,5
- (3) cinétique d'hydrolyse de l'acide polyaspartique (déduite des courbes (1) et de (2).
  - (a) salification des groupements carboxyliques libres
  - (b) hydrolyse des cycles imides.

FIGURE 50.-

Séparation électrophorétique des dérivés monodinitrophénylés de la lysine, obtenus après hydrolyse acide des DNP-polypeptides dans lesquels la lysine a été condensée à partir de son monochlorhydrate.

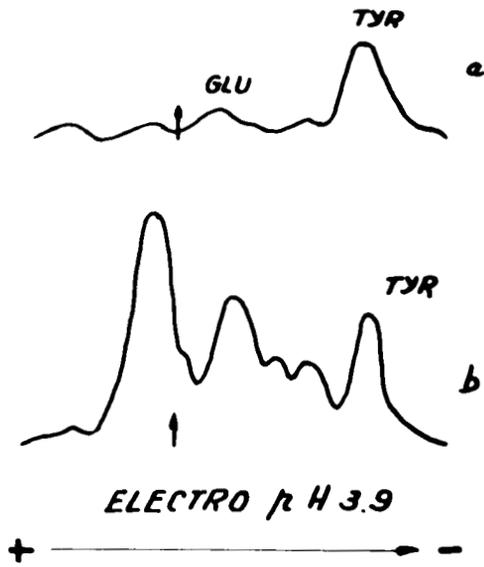


FIGURE 47

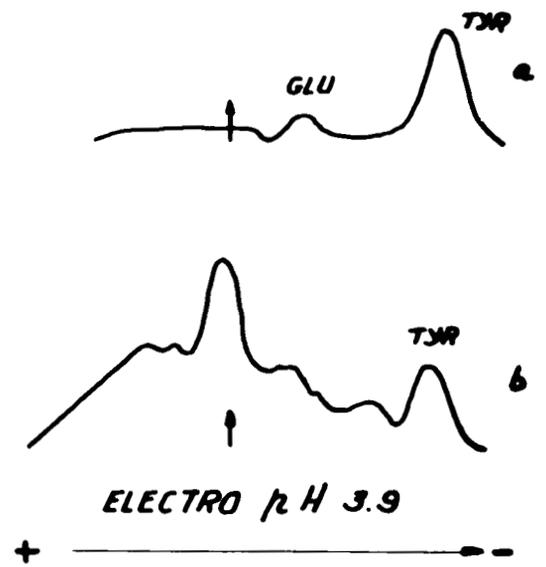


FIGURE 48

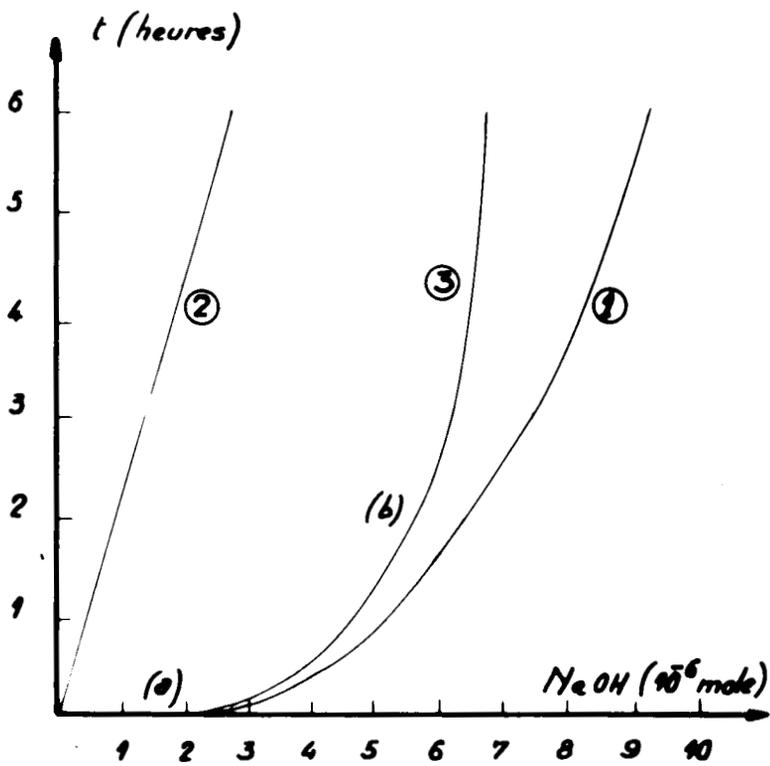


FIGURE 49

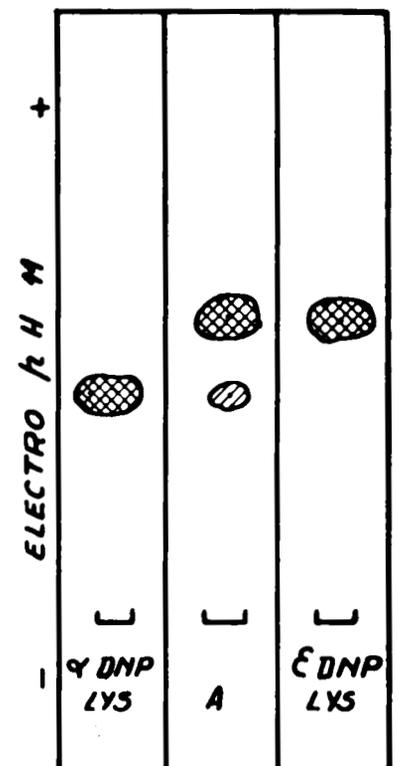


FIGURE 50

FIGURE 5I.-

Cinétiques de disparition de l'acide pyroglutamique (A) et du glycolle (B), et cinétiques d'apparition des peptides pyroglutamyl-glycine (A-B) et pyroglutamyl-glycyl-glycine (A-B-B)

T° de réaction : 170°C

rapport  $\frac{\text{glycolle}}{\text{ac. pyroglutamique}} = 1$



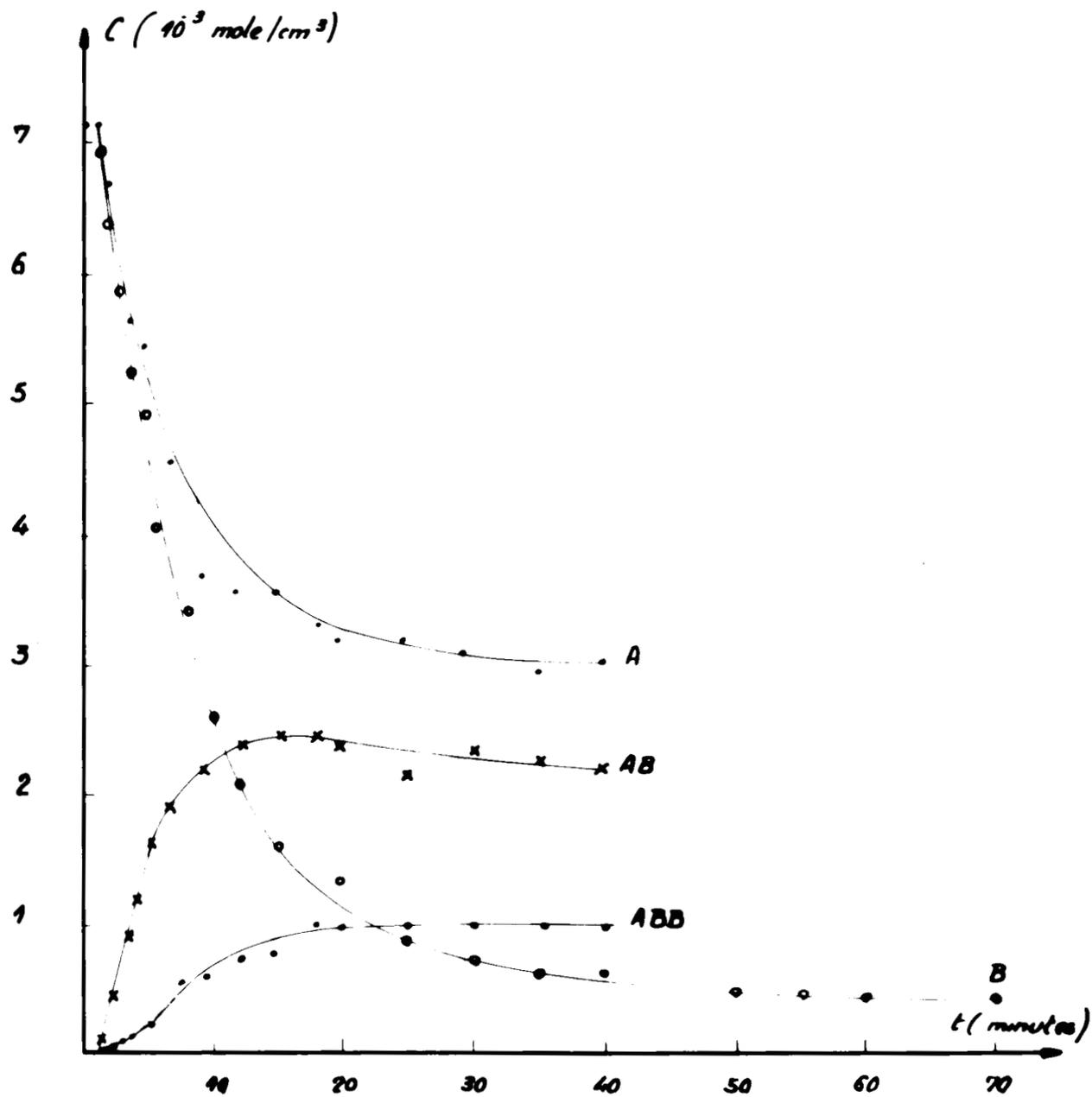


FIGURE 51



FIGURE 52.-

Variation de la densité optique du biuret en fonction du temps, pour différents mélanges d'acide pyroglutamique (A) et de glycolle (B) La densité optique est exprimée pour une concentration de 1 mm<sup>3</sup> de polypeptide par ml de solution.

FIGURE 53.-

Variation du rapport  $\frac{V_0}{[Bo]}$  en fonction de la concentration de l'acide pyroglutamique. (A)  
 $V_0$  = pente au temps  $t = 0$  des courbes de la figure

52

$[Bo]$  = concentration du glycolle au temps  $t = 0$ .

FIGURE 54.-

Variation de  $\log \frac{V_0}{[Bo]}$  en fonction de  $-\log [A_0]$

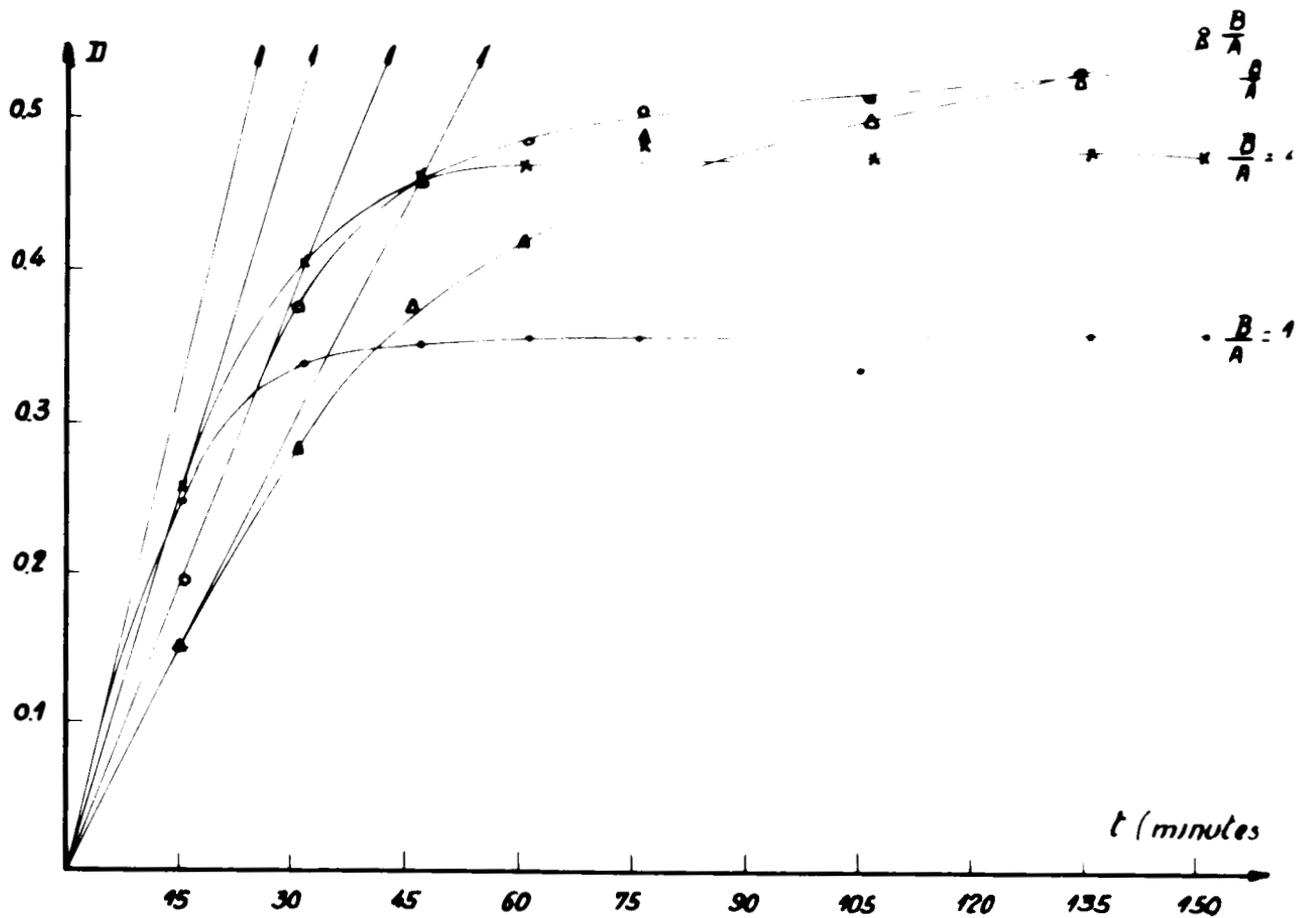


FIGURE 52

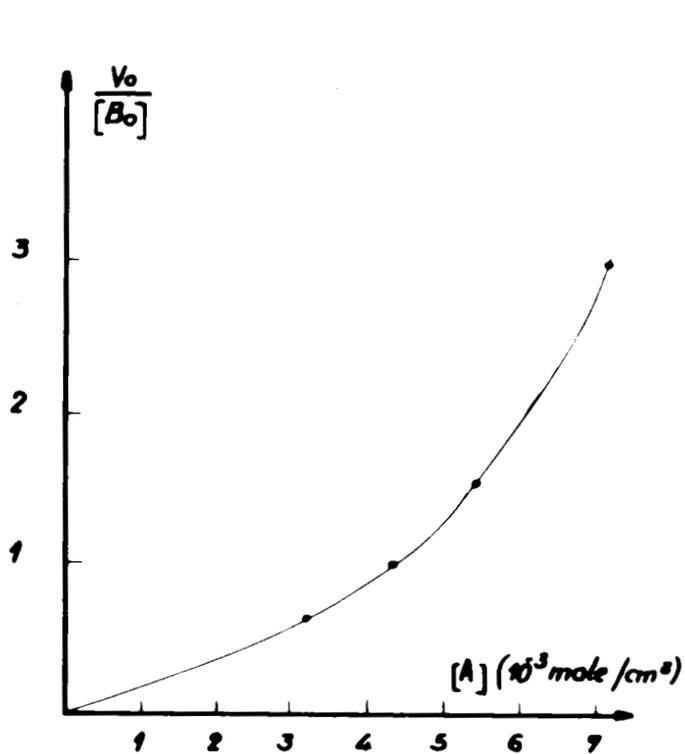


FIGURE 53

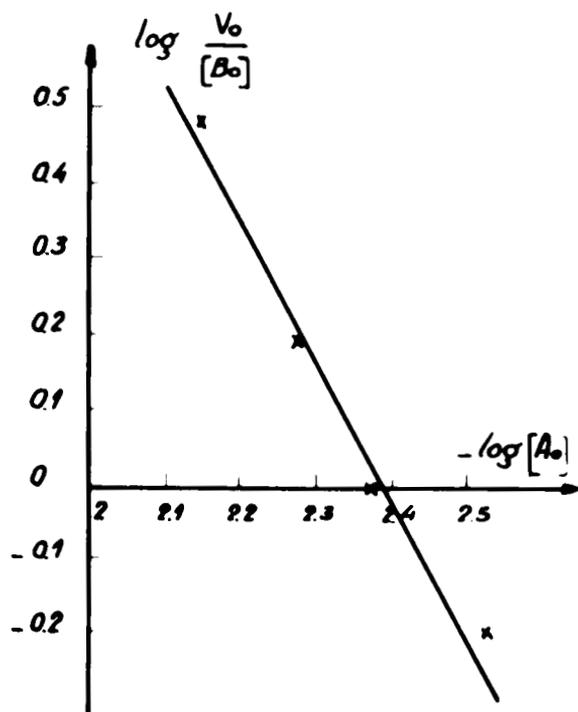


FIGURE 54

FIGURE 55.-

Cinétique de disparition du glycolle en fonction du temps, pour différents mélanges  $\frac{B}{A}$

B = acide glycolle

A = acide pyroglutamique

$N_B$  est exprimé en nombre de mole.

FIGURE 56.-

Cinétique de disparition du glycolle en fonction du temps pour différents mélanges  $\frac{B}{A}$

[B] est exprimé en concentration

Les courbes de la figure 56 sont déduites des courbes de la figure 55, en divisant  $N_B$  par le volume du mélange réactionnel.

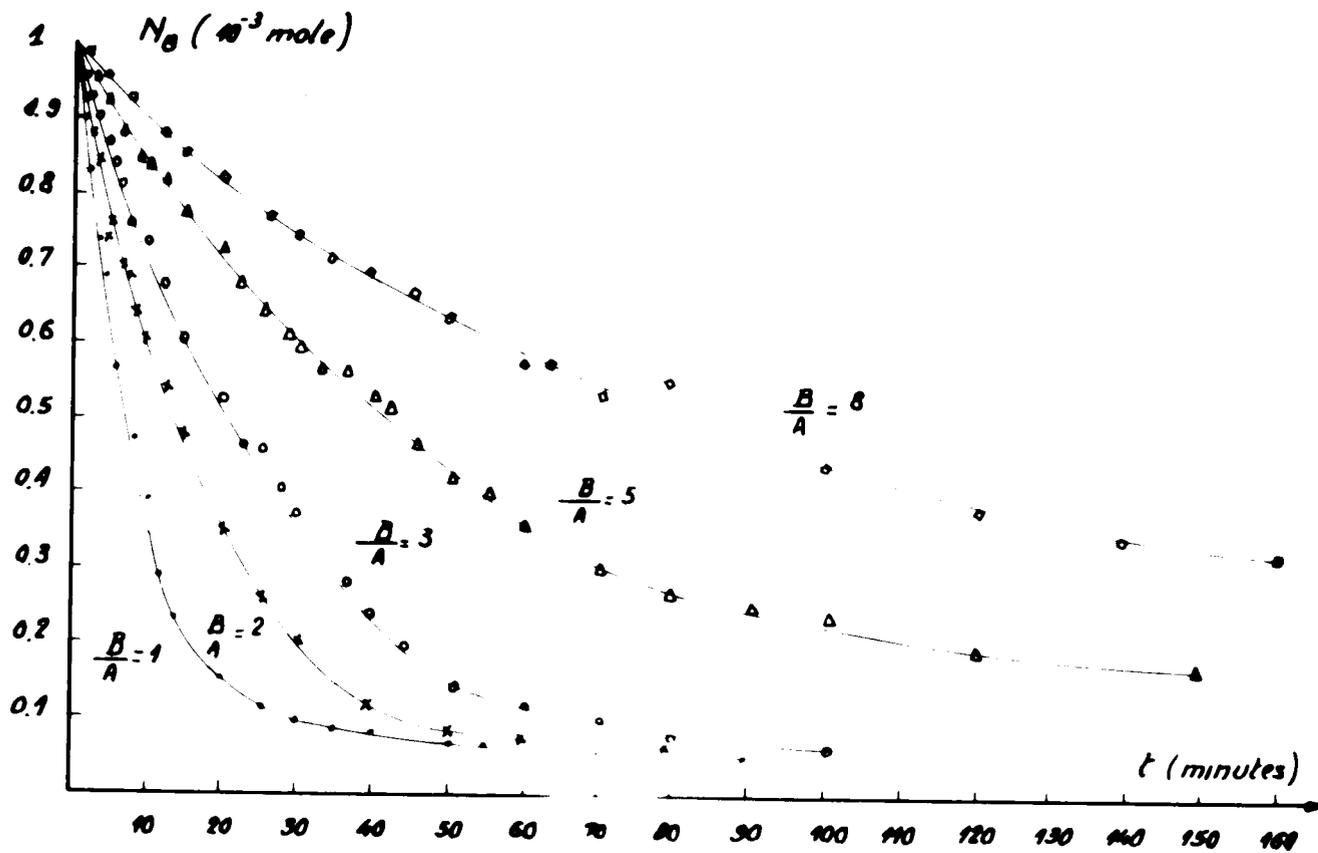


FIGURE 55

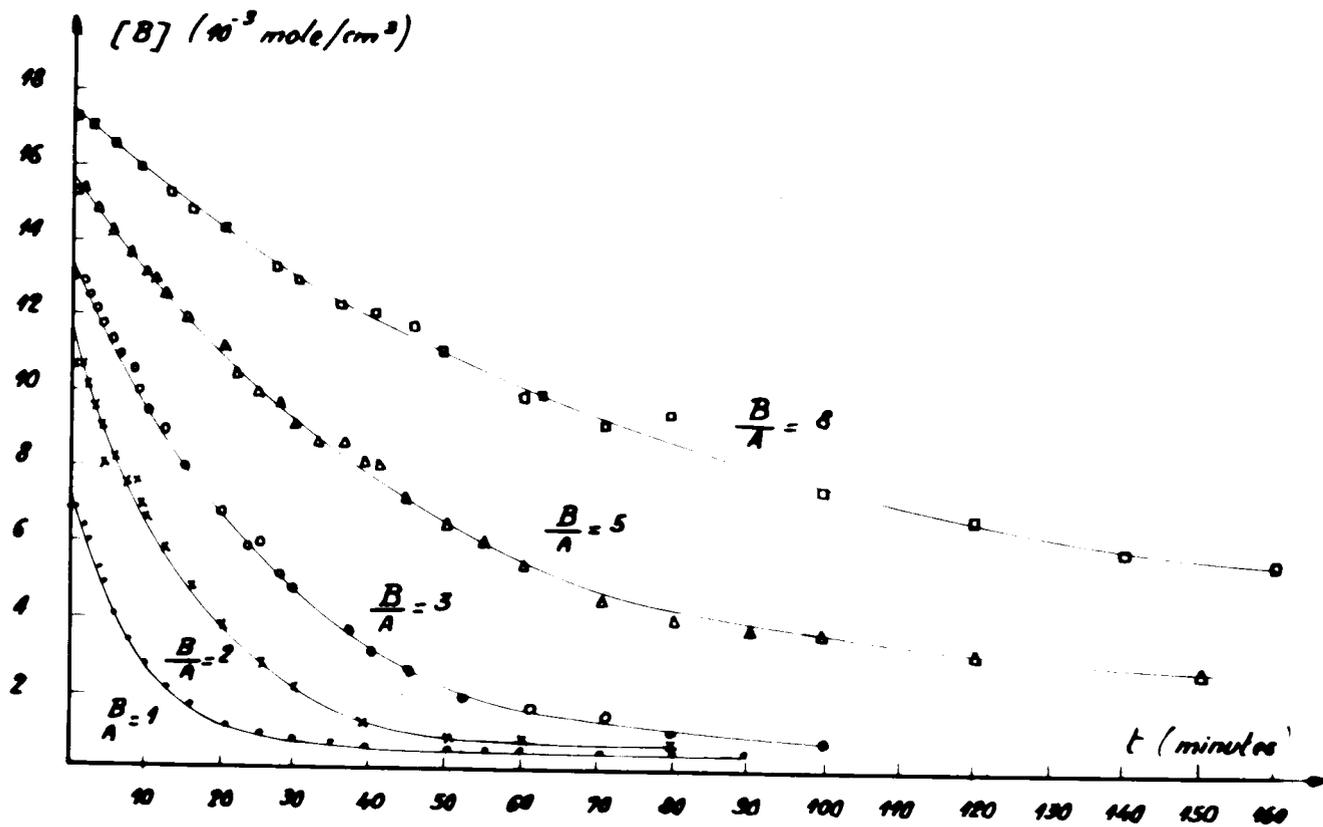


FIGURE 56

FIGURE 57.-

Variation du  $\log \frac{[Bo]}{[B]}$  en fonction du temps pour  
différents rapports  $\frac{B}{A}$

$[Bo]$  = concentration en glyocolle au temps  $t=0$

B = glyocolle

A = acide pyroglutamique

FIGURE 58.-

Variation de  $-\log k$  en fonction de  $-\log[A_0]$

$k$  = pente des courbes de la figure 57.

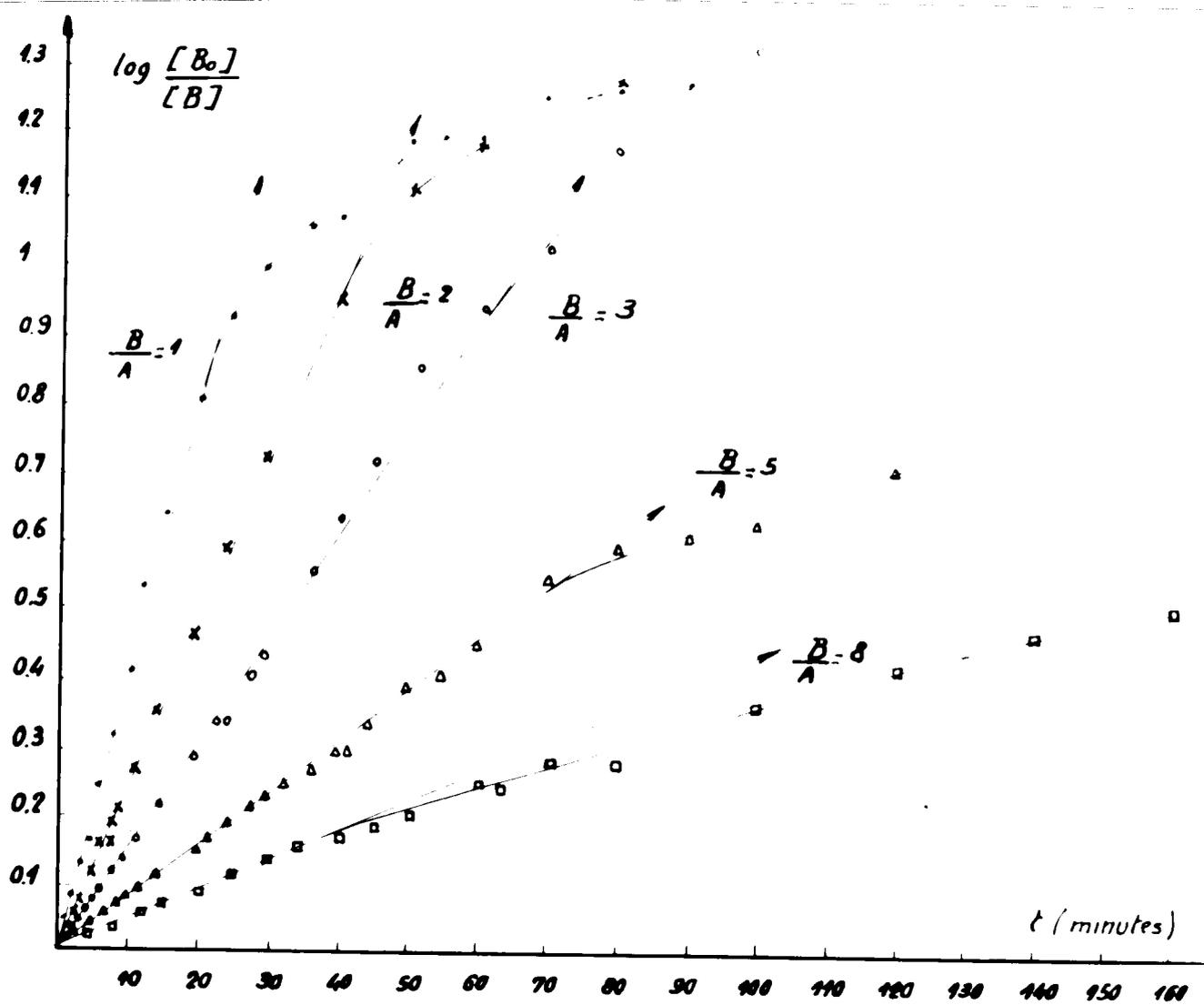


FIGURE 57

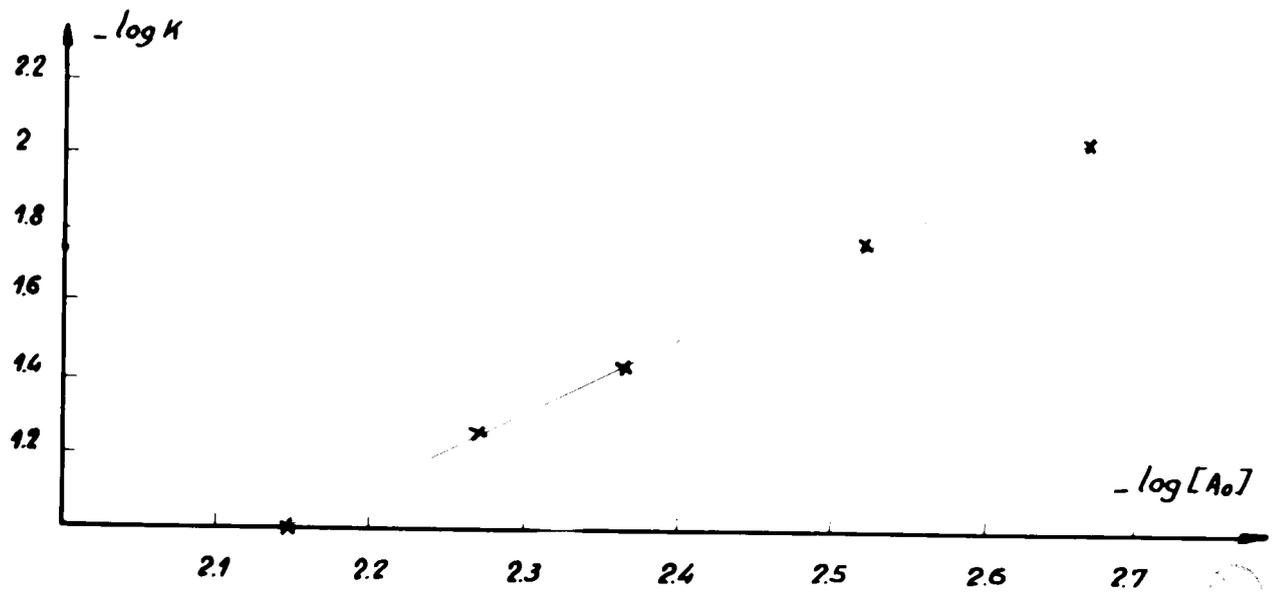


FIGURE 58

FIGURE 59.-

Séparation électrophorétique des dérivés monodinitrophénylés de la lysine, obtenus après hydrolyse totale acide de la DNP-polylysine.

FIGURE 60.-

Identification électrophorétique du dérivé monodinitrophénylé de l'ornithine obtenu par hydrolyse du produit de condensation dinitrophénylé de l'ornithine base.

FIGURE 61.-

Séparation électrophorétique des produits de condensation de l'ornithine base et de l'acide  $\alpha, \gamma$  diaminobutyrique base.

FIGURE 62

Spectre d'absorption du biuret de différents polypeptides :

A : polyglycocolle (fraction soluble dans l'eau)

B : polypeptide adialysable

C : triglycine

FIGURE 63.-

Variation de la vitesse électrophorétique sur papier, du polypeptide de poids moléculaire 4600, en fonction du pH.

V exprime la distance parcourue par rapport au glucose, par le polypeptide pendant 4 heures sous 2,35 volts par cm.

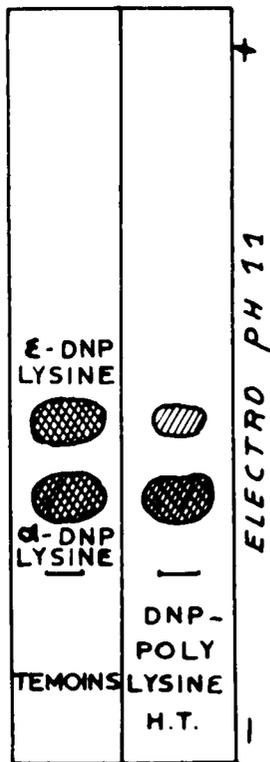


FIGURE 59

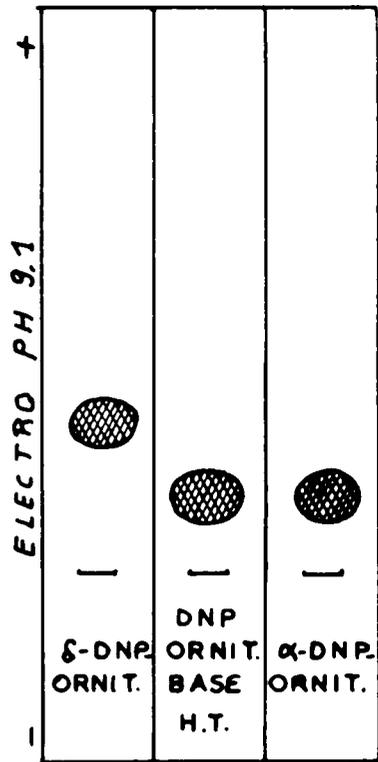


FIGURE 60

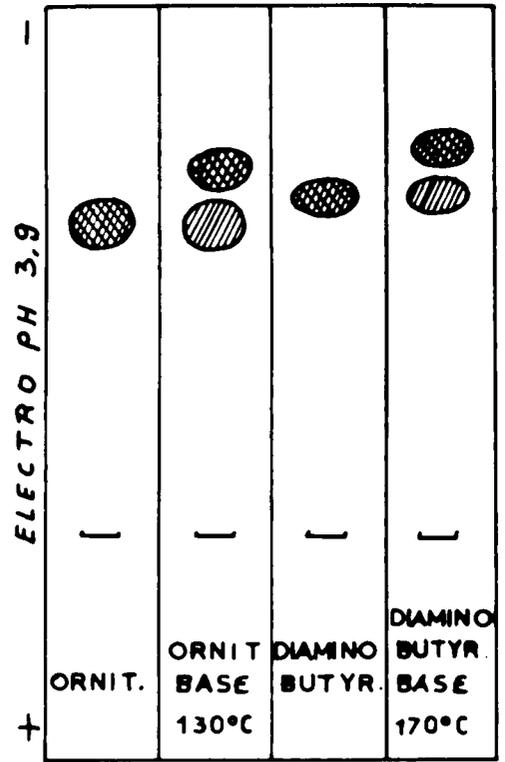


FIGURE 61

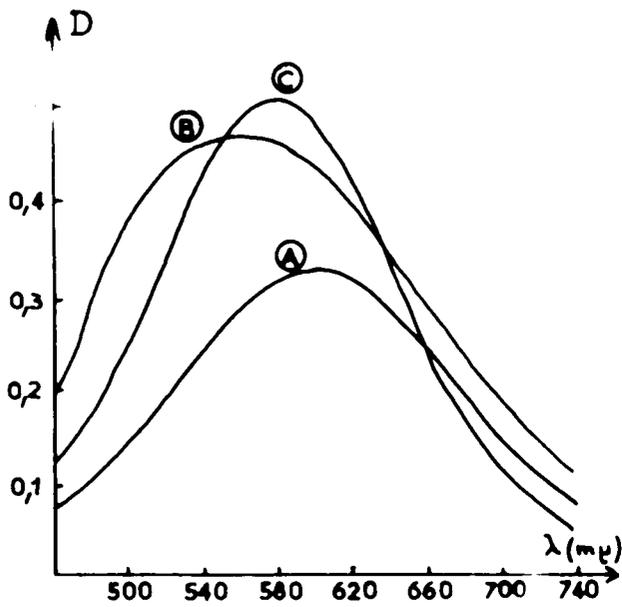


FIGURE 62

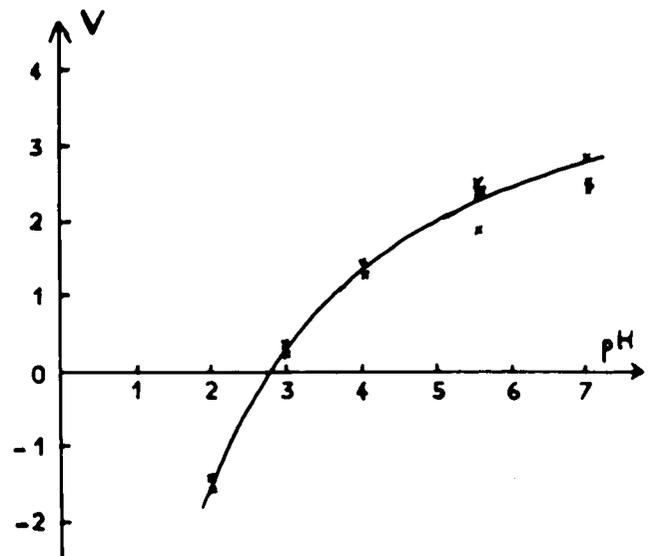


FIGURE 63

FIGURE 64.-

Spectre I.R. de l'acide pyroglutamique

FIGURE 65.-

Spectre I.R. du pyroglutamyl-glycine de synthèse

FIGURE 66.-

Spectre I.R. du polyglycocolle insoluble

FIGURE 67.-

Spectre I.R. d'un polyglycocolle synthétisé  
par une autre méthode (ELLIOTT) (15)

FIGURE 68.-

Spectre I.R. du polyglycocolle de HARADA et  
FOX (27)

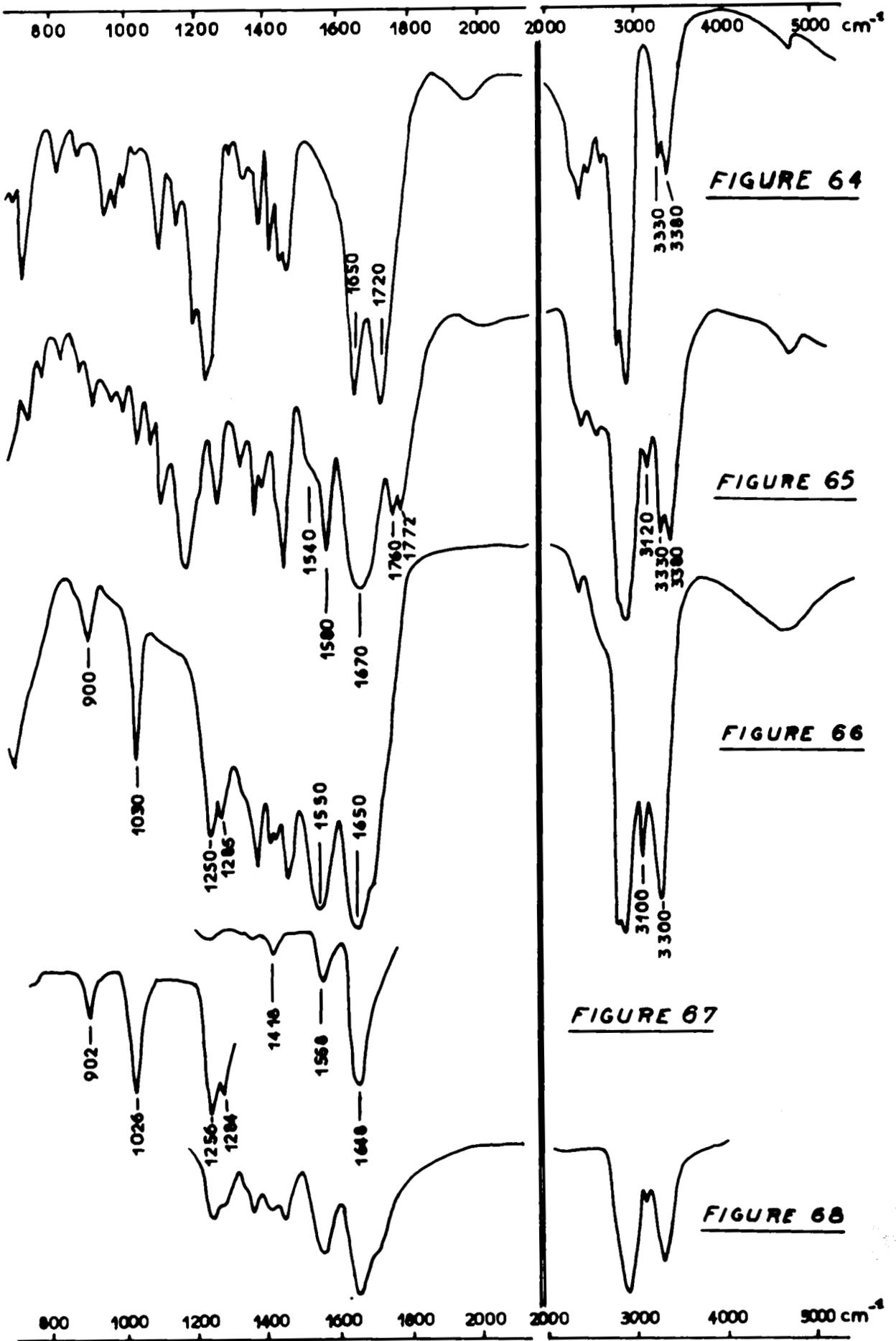


FIGURE 69.-

Spectre I.R. de l'acide polyaspartique (forme polyimide)

FIGURE 70.-

Spectre I.R. du polypeptide de poids moléculaire 4.600.

FIGURE 71.-

Cinétique d'hydrolyse à deux températures différentes de la polyalanine, par la carboxypeptidase.

En ordonnée : pourcentage en poids de l'alanine libérée par rapport au poids initial de peptide.

(516)  
6/11/51

