

50376  
1973  
177

Numéro d'ordre : 149

50376  
1973  
177

**UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE**

---

**THÈSE**

présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR - INGÉNIEUR**

par

**Brigitte PLANCHON**



Les méthodes chimiques récurrentes  
de détermination de la séquence N-Terminale  
des Peptides et des Protéines :  
La méthode d'Edman

Membres du Jury : MM. les Professeurs C. GLACET

G. BISERTE

J. MONTREUIL

MM. J. HAN

J. SCHWOOB

Président

Rapporteur

Examineur

»

Invité

Soutenu le 14 Novembre 1973



PROFESSEURS TITULAIRES (suite)

|                           |                                  |
|---------------------------|----------------------------------|
| M. MAILLET Pierre         | Sciences Economiques et Sociales |
| M. MONTARIOL Frédéric     | Chimie Appliquée                 |
| M. MONTREUIL Jean         | Chimie Biologique                |
| M. POUZET Pierre          | Informatique (Lille)             |
| M. PROUVOST Jean          | Géologie Minéralogie             |
| Mme SCHWARTZ Marie-Hélène | Analyse Supérieure               |
| M. TILLIEU Jacques        | Physique Théorique               |
| M. TRIDOT Gabriel         | Chimie                           |
| M. VAILLANT Jean          | Mathématiques                    |
| M. VIDAL Pierre           | Automatique                      |
| M. VIVIER Emile           | Biologie Animale                 |
| M. WERTHEIMER Raymond     | Physique                         |
| M. ZEYTOUNIAN Radyadour   | Mathématiques                    |

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

|                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| M. BOUISSET Simon       | Physiologie Animale      |
| M. DELHAYE Michel       | Chimie                   |
| M. DERCOURT Jean-Michel | Sciences de la Terre     |
| M. LEBRUN André         | Electronique (Lille)     |
| M. LEHMANN Daniel       | Mathématiques            |
| M. LINDER Robert        | Botanique                |
| M. LUCQUIN Michel       | Chimie Physique          |
| M. PARREAU Michel       | Mathématiques Appliquées |
| M. SCHILTZ René         | Physique                 |

PROFESSEURS SANS CHAIRE

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| M. BELLET Jean            | Physique        |
| M. BILLARD Jean           | Physique        |
| M. BODARD Marcel          | Botanique       |
| M. BOILLET Pierre         | Physique        |
| M. BONNOT Ernest          | Biologie        |
| M. BRIDOUX Michel         | I.U.T. Béthune  |
| M. CAPURON Alfred         | Chimie Minérale |
| M. DEPREZ Gilbert         | I.U.T. Lille    |
| M. DEVRAINNE Pierre       | Chimie Minérale |
| M. GOUDMAND Pierre        | Chimie Physique |
| M. GRUSON Laurent         | Mathématiques   |
| M. GUILBAULT Pierre       | Biologie        |
| M. LABLACHE-COMBIER Alain | Chimie          |
| M. LACOSTE Louis          | Biologie        |
| M. LANDAIS Jean           | Chimie          |
| Mme LEHMANN Josiane       | Mathématiques   |
| M. LOUCHEUX Claude        | Chimie          |
| M. MAES Serge             | Physique        |
| Mle MARQUET Simone        | Mathématiques   |
| M. MONTEL Marc            | Physique        |
| M. MONTUELLE Bernard      | I.U.T. Lille    |
| M. PANET Marius           | I.E.E.A.        |
| M. SALMER Georges         | I.E.E.A.        |
| M. SEGUIER Guy            | I.U.T. Béthune  |

MAITRES DE CONFERENCES (et chargé de fonctions)

|                             |                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| M. ADAM Michel              | Economie Politique                |
| M. ANDRE Charles            | Sciences Economiques              |
| M. ANGRAND Jean-Pierre      | Géographie                        |
| M. ANTOINE Philippe         | Mathématiques                     |
| M. AUBIN Thierry            | Mathématiques                     |
| M. BART André               | Biologie                          |
| M. BEGUIN Paul              | Mécanique des Fluides             |
| M. BKOUCHE Rudolphe         | Mathématiques                     |
| M. BOILLY Bénoni            | Biologie                          |
| M. BONNEMAIN Jean-Louis     | Biologie Végétale                 |
| M. BOSQ Denis               | Mathématiques                     |
| M. BREZINSKI Claude         | I.E.E.A.                          |
| M. BRUYELLE Pierre          | Géographie et Aménagement spatial |
| M. CARREZ Christian         | I.E.E.A.                          |
| M. CORDONNIER Vincent       | Informatique                      |
| M. COURTOIS Jean            | Physique                          |
| M. COQUERY Jean-Louis       | Biologie                          |
| M. COULON Jean              | I.E.E.A.                          |
| Mlle DACCHARI Monique       | Géographie et Aménagement spatial |
| M. DEBOURSE Jean-Pierre     | Sciences Economiques et Sociales  |
| M. DEBRABANT Pierre         | Sciences Appliquées               |
| M. DELAUNAY Jean-Claude     | Sciences Economiques et Sociales  |
| M. DERIEUX Jean-Claude      | Biologie (I.U.T.)                 |
| M. DOUKHAN Jean-Claude      | Physique                          |
| M. DRIEUX Baudouin          | I.E.E.A.                          |
| M. DUEE Gérard              | Sciences de la Terre              |
| M. DYMENT Arthur            | Mathématiques                     |
| M. ESCAIG Bertrand          | Physique                          |
| Mme EVRARD Micheline        | Chimie (I.U.T.)                   |
| M. FONTAINE Jean-Marie      | I.U.T. Lille                      |
| M. FOURNET Bernard          | I.U.T. Lille                      |
| M. FROELICH Daniel          | Sciences Appliquées               |
| M. GAMBLIN André            | Géographie                        |
| M. GOBLOT Rémi              | Mathématiques                     |
| M. GOSSELIN Gabriel         | Sociologie                        |
| M. GRANELLE Jean-Jacques    | Sciences Economiques              |
| M. GUILLAUME Henri          | Sciences Economiques et Sociales  |
| M. HECTOR Joseph            | S.E.N. Calais                     |
| M. HERMAN Maurice           | Physique                          |
| M. HUARD DE LA MARRE Pierre | I.E.E.A.                          |
| M. JOURNEL Gérard           | Sciences Appliquées               |
| Mlle KOSMANN Yvette         | Mathématiques                     |
| M. KREMBEL Jean             | Chimie                            |
| M. LAURENT François         | Automatique                       |
| Mlle LEGRAND Denise         | Mathématiques                     |
| Mlle LEGRAND Solange        | Mathématiques                     |
| M. LENTACKER Firmin         | Géographie et Aménagement Spatial |
| M. LEROY Jean-Marie         | E.N.S.C.L.                        |
| M. LEROY Yves               | Electronique (Lille)              |

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

|                            |                                   |
|----------------------------|-----------------------------------|
| M. LHENAFF René            | Géographie                        |
| M. LOCQUENEUX Robert       | Physique                          |
| M. LOUAGE Francis          | Sciences Appliquées               |
| M. MAHIEU Jean-Marie       | Physique (I.U.T. Lille)           |
| Mme MAILLET Monique        | Sciences Economiques et Sociales  |
| M. MAIZIERES Christian     | I.E.E.A.                          |
| M. MALAUSSENA Jean-Louis   | Sciences Economiques et Sociales  |
| M. MESSELYN Jean           | Physique                          |
| M. MIGEON Michel           | Chimie (Sciences Appliquées)      |
| M. MOTZKIN Joseph          | Mathématiques                     |
| M. MONTUELLE Bernard       | I.U.T. Lille                      |
| M. NICOLE Jacques          | Chimie (E.N.S.C.L.)               |
| M. PAQUET Jacques          | Sciences Appliquées               |
| M. PARSY Fernand           | Mathématiques                     |
| M. PECQUE Marcel           | Chimie (Béthune)                  |
| M. PERROT Pierre           | Chimie                            |
| M. PERTUZON Emile          | Biologie                          |
| M. PONSOLLE Louis          | Chimie (Valenciennes)             |
| M. POVY Jean-Claude        | Sciences Appliquées               |
| M. RACZY Ladislav          | Physique                          |
| M. ROGALSKI Marc           | Mathématiques                     |
| M. ROUSSEAU Jean-Paul      | Physiologie Animale               |
| M. ROY Jean-Claude         | Biologie                          |
| Mme N'GUYEN VAN CHI Régine | Géographie et Aménagement Spatial |
| M. SIMON Michel            | Psychologie                       |
| M. SLIWA Henri             | Chimie                            |
| M. SMET Pierre             | Physique                          |
| M. SOMME Jean              | Géographie                        |
| Mlle SPIK Geneviève        | Chimie Biologique                 |
| M. THERY Pierre            | Calais                            |
| M. TOULOTTE Jean-Marc      | Sciences Appliquées               |
| M. TREANTON Jean-René      | Sciences Economiques et Sociales  |
| M. VANDORPE Bernard        | Chimie Physique                   |
| M. VILETTE Michel          | Génie Mécanique (Béthune)         |
| M. WERNER Georges          | Informatique (I.U.T. Lille)       |
| M. WATERLOT Michel         | Géologie                          |
| Mme ZINN JUSTIN Nicole     | Mathématiques                     |

## AVANT-PROPOS

---

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine.

A cette occasion, nous sommes heureux de pouvoir exprimer notre profond respect et sincère attachement à Monsieur le Professeur BOULANGER qui nous a accueilli dans son Laboratoire et nous a permis de réaliser ce travail.

Nos plus sincères remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur GLACET qui nous a fait profiter de la clarté de son enseignement et qui a accepté de présider notre Jury de Thèse.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur MONTREUIL qui nous a fait l'honneur de juger notre travail.

Nous prions Monsieur le Professeur BISERTE de trouver ici l'expression de notre admiration et de notre gratitude.

Nous remercions Monsieur le Professeur DAUTREVAUX qui a bien voulu nous conseiller et nous aider dans la présentation de notre travail.

C'est avec le plus grand plaisir que nous trouvons l'occasion de remercier ici notre Directeur de travail : Monsieur HAN, Maître de Recherches au C.N.R.S.. Vous nous avez fait profiter de vos connaissances scientifiques exceptionnelles et nous avons apprécié votre compétence dans le domaine de la séquence des protéines ; nous osons espérer que cette thèse sera de quelque utilité pour les travaux futurs du laboratoire.

Le personnel de la Société SOCOSI nous a fait bénéficier avec gentillesse de ses connaissances de la dégradation automatique et nous sommes heureux de remercier Monsieur SCHWOOB qui a accepté de participer à ce Jury de Thèse.

Nous exprimons nos remerciements à tous nos amis du laboratoire de Biochimie avec lesquels nous avons été heureux de travailler, ainsi qu'à tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail et tout particulièrement à Madame DAO, Madame MORANDI et Monsieur VANDEPERRE.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante  
en collaboration avec

HAN K., DAUTREVAUX M. et BISERTE G.

"Détermination de la séquence N-terminale des protéines et des  
peptides par la méthode de dégradation d'Edman manuelle et  
automatique".

Ann. Pharm. Franç., sous presse.



Je dédie ce travail à mes parents

LES METHODES CHIMIQUES RECURRENTES DE  
DETERMINATION DE LA SEQUENCE N-TERMINALE DES PEPTIDES  
ET DES PROTEINES : LA METHODE D'EDMAN

## ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

|                      |   |                                |
|----------------------|---|--------------------------------|
| P.T.H.               | : | Phényl 3 thio 2 hydantoïne     |
| D.N.S.               | : | Dansyl-amino-acide             |
| MET                  | : | Méthionine                     |
| ILE                  | : | Isoleucine                     |
| LEU                  | : | Leucine                        |
| PHE                  | : | Phénylalanine                  |
| ALA                  | : | Alanine                        |
| VAL                  | : | Valine                         |
| LYS                  | : | Lysine                         |
| ARG                  | : | Arginine                       |
| HIS                  | : | Histidine                      |
| ASP                  | : | Acide aspartique               |
| GLU                  | : | Acide glutamique               |
| ASN                  | : | Asparagine                     |
| GLN                  | : | Glutamine                      |
| THR                  | : | Thréonine                      |
| SER                  | : | Sérine                         |
| CysSO <sub>3</sub> H | : | Acide cystéique                |
| PRO                  | : | Proline                        |
| GLY                  | : | Glycine                        |
| MeS                  | : | Méthionine sulfone             |
| TRP                  | : | Tryptophanne                   |
| CmCys                | : | S-carboxy-méthyl-cystéine      |
| ASX                  | : | Acide aspartique ou asparagine |
| GLX                  | : | Acide glutamique ou glutamine  |
| T.M.S.               | : | Triméthylsilylé                |

---

LES METHODES CHIMIQUES RECURRENTES DE DETERMINATION DE LA SEQUENCE  
N-TERMINALE DES PEPTIDES ET DES PROTEINES : LA METHODE D'EDMAN

---

INTRODUCTION

CHAPITRE I : METHODES MANUELLES RECURRENTES DE DETERMINATION  
DE SEQUENCE N-TERMINALE

- I - METHODE DE DEGRADATION AU PHENYLISOCYANATE
- II - METHODE DE DEGRADATION AU CYANATE
- III - METHODE DE DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

A) La méthode d'Edman

- 1 - Principe
- 2 - Identification des PTH-amino-acides
  - a - Chromatographie sur papier
  - b - Réaction à l'azoture de sodium

B) Evolution de la méthode de dégradation  
récurrente

- 1 - Méthodes anciennes de dégradation
  - a - Identification directe des PTH-amino-acides
    - \* Technique de Fraenkel-Conrat
    - \* Technique de Margoliash
  - b - Méthode soustractive
    - \* Principe
    - \* Technique de Koenigsberg et Hill
    - \* Technique de Dopheide
    - \* Technique d'Elzinga et coll.

c- Méthode par régénération

\* Technique de Delange

2 - Méthodes modernes de dégradation récurrente

a - Identification directe des PTH-amino-acides

\* Technique de Niall et d'Edman

\* Technique d'Edman et Begg

b - Méthode du couplage dansyl-Edman

C) Méthodes d'identification modernes des PTH-amino-acides

1 - Chromatographie sur couches minces de silica-gel (support verre)

2 - Chromatographie sur couches minces de silica-gel (support de plastique)

3 - Identification des PTH-arginine, histidine, acide cystéique

4 - Chromatographie sur couche mince de polyamide

5 - Chromatographie en phase gazeuse

6 - La spectrométrie de masse

7 - La régénération des acides aminés

8 - Autres méthodes d'identification des PTH-amino-acides

IV - VARIANTES DE LA METHODE D'EDMAN

A) Utilisation du méthylisothiocyanate

B) Utilisation du naphtylisothiocyanate

C) Utilisation de dérivés nitrés du phényl-isothiocyanate

D) Utilisation du pentafluorophénylisothiocyanate

V - APPLICATION PERSONNELLE DE LA METHODE MANUELLE

A) Techniques utilisées

1 - Différentes étapes de la dégradation

a - Réaction de couplage

b - Extraction des thiourées, des dithiourées et de l'excès de réactif

c - Réaction de clivage

d - Réaction de conversion

## 2 - Identification des PTH-amino-acides

- a - Chromatographie sur couche mince de silica-gel
- b - Identification des PTH-arginine, histidine, acide cystéique
- c - Chromatographie en phase gazeuse

## B) Résultats

- 1 - Détermination de la structure d'un peptide trypsique de la myoglobine de blaireau
  - a - Méthodes classiques
  - b - Dégradation récurrente
- 2 - Détermination de la structure du peptide C-terminal de la myoglobine de blaireau
  - a - Méthodes classiques
  - b - Dégradation récurrente

## CONCLUSION

## CHAPITRE II : LA DEGRADATION AUTOMATIQUE (LE SEQUENCEUR D'EDMAN)

### LE SEQUENCEUR SOCOSI

#### A - Description

##### I - Première partie : l'ensemble chimique

- 1 - Ensemble centrifugeuse, coupe de réaction
  - a - La coupe de réaction
  - b - La cloche
  - c - Le système d'entraînement, la broche
  - d - Chauffage et régulation de la température
  - e - Les lignes de collection et d'alimentation
- 2 - Les vannes chaudes
  - a - La vanne de grand vide
  - b - La vanne de prévide
  - c - La vanne d'entrée d'azote

- 3 - La vanne à "6 voies"
- 4 - La vanne à "3 voies"
- 5 - Les réservoirs de stockage des solvants ou des réactifs
- 6 - Le collecteur de fractions

## II - Le bloc électronique

- 1 - La matrice double à fiches à diodes
- 2 - Les différentes commandes manuelles
- 3 - Les vannes de sécurité

## B - Manipulation du Séquenceur

- I - Dissolution et dépôt de la protéine ou du peptide
- II - Le cycle à blanc
- III - Traitement des thiazolinones amino-acides

## C - Résultats personnels

- 1 - L'apomyoglobine de Mouton (46 résidus)
- 2 - Le peptide médian de la globine de mouton (39 résidus)
- 3 - L'apomyoglobine de Chien (28 résidus)
- 4 - Le peptide médian de l'apomyoglobine de porc (42 résidus)
- 5 - Le peptide médian de l'apomyoglobine de blaireau (31 résidus)
- 6 - La chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine de blaireau (42 résidus)
- 7 - Histone (18 résidus)

## Les autres séquenceurs

- A - Le séquenceur Beckman
- B - Le Séquenceur Jéol

## Discussion et conclusion

### A - Problèmes posés par la méthode automatique

- 1 - Le prix de revient de l'appareil
- 2 - Les limites de l'appareil
- 3 - Le quadrol

**B - Résolution partielle du problème**

- 1 - Utilisation d'autres tampons de couplage
- 2 - Procédé de Braunitzer
- 3 - Autre modification chimique des peptides

**C - Avantages de la méthode automatique dans l'étude de la structure covalente des protéines**

- 1 - Rapidité de la technique
- 2 - Détermination de longues séquences
- 3 - Détermination de la pureté d'une protéine
- 4 - Détermination de scissions internes
- 5 - Stratégie de GRAY

**CONCLUSION GENERALE**



## INTRODUCTION

MARTIN et SYNGE, Du VIGNEAUD, SANGER, il y a une vingtaine d'années ; PORTER, EDELMAN, ANFINSEN, HIRS, MOORE et STEIN plus récemment, ont reçu le Prix Nobel, pour leurs travaux sur la chimie des protéines et des peptides.

Depuis la détermination de la structure de la gramicidine S en 1947, par CONNOR, GORDON, MARTIN et SYNGE ( 1 ), des progrès considérables ont été réalisés.

Le développement de diverses méthodes a permis l'évolution de la chimie des protéines. Ce sont: les procédés de fractionnement, de purification et d'analyse des substances peptidiques et protéiques, la découverte et la mise au point de méthodes telles que la coupure chimique et l'hydrolyse enzymatique spécifiques, l'analyse qualitative et quantitative d'acides aminés et enfin la dégradation récurrente d'Edman.

En permettant d'adapter les macrométhodes en microanalyses, la découverte de la chromatographie sur papier s'est révélée d'une importance capitale.

Dans le domaine structural, les premières séquences connues ont été celles de deux hormones hypophysaires : la vasopressine et l'ocytocine (9 acides aminés). Puis des molécules plus complexes ont été étudiées : l'insuline en 1952 par SANGER ( 2 ) (51 acides aminés), le glucagon ( 3 ) (29 acides aminés), l'hormone adrénocorticotrope ou A.C.T.H. ( 4 ) ( 5 ) (39 acides aminés).

En 1961, BRAUNITZER achevait la structure des deux chaînes de l'hémoglobine (141 et 146 résidus) ( 6 ) ( 7 ) ; celle de la ribonucléase (124 acides aminés) a été décrite en 1963, par SMYTH, MOORE et STEIN ( 8 ).

Parallèlement aux développements des procédés qui ont permis de déterminer la structure primaire de chaînes de plus en plus

complexes, les techniques d'études physiques telles que l'analyse par diffraction des rayons X (PERUTZ et KENDREW ( 9 ) ( 10 ) , la dispersion optique rotatoire (HARRISSON et BLOUT) ( 11 ) , l'analyse dans l'ultra-violet polarisé et non polarisé, dans l'infra-rouge, la résonance paramagnétique électronique, et la résonance magnétique nucléaire ont permis d'accéder à une conformation tridimensionnelle de plus en plus précise des protéines.

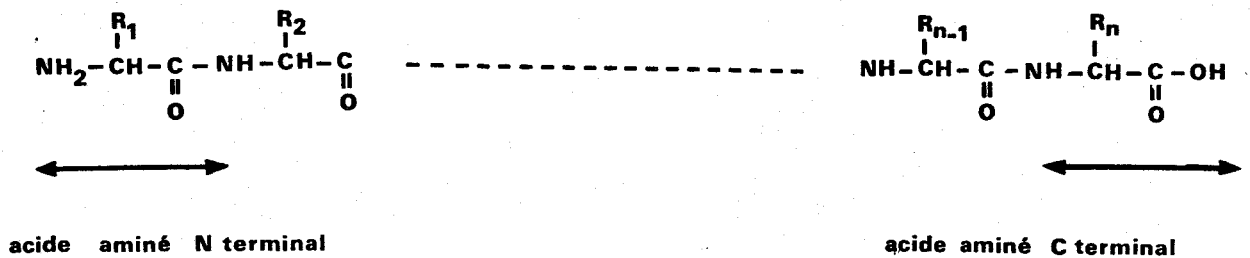
La connaissance simultanée des structures covalentes et conformationnelles est fondamentale car elle permet d'expliquer l'activité des macromolécules étudiées.

La détermination de la structure covalente des myoglobines de Cheval ( 12 ) , de Boeuf ( 13 ) , puis de Mouton ( 14 ) , de Chien, de Porc et de Blaireau a été réalisée dans notre laboratoire.

CHAPITRE I

METHODES MANUELLES RECURRENTES DE DETERMINATION  
DE SEQUENCES N-TERMINALES

Les protéines et les peptides sont constitués d'un enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons amides particulières : les liaisons peptidiques. La chaîne peptidique peut être représentée selon la formule générale suivante



Les méthodes chimiques, permettant de déterminer la séquence en acides aminés utilisent la réactivité d'une des extrémités de la chaîne, soit du résidu N-terminal qui a son groupe  $\alpha$ -aminé libre, soit du résidu C-terminal qui a son groupe  $\alpha$ -carboxylique libre.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la détermination de l'acide aminé et de la séquence N-terminale et en particulier à la méthode récurrente, appelée méthode de dégradation d'Edman.

La dégradation d'Edman, conçue en 1950 par Pehr Edman, permet d'identifier les uns après les autres les résidus d'acides aminés sous forme de phénylthiohydantoïnes. La méthode est désormais automatisée (Séquenceur ou Sequanator).

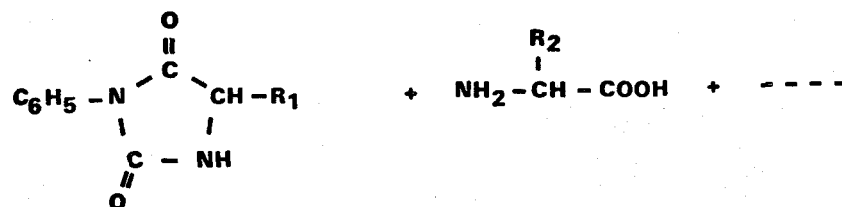
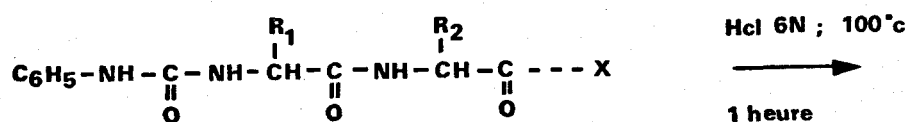
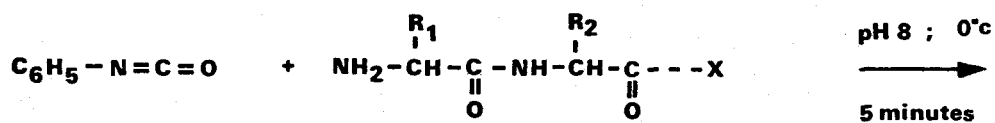
Elle est actuellement préférée à d'autres méthodes de dégradation, que nous exposerons également.

I - METHODE DE DEGRADATION AU PHENYLISOCYANATE

En 1927, BERGMANN et coll. ( 15 ) proposent une méthode de détermination de l'acide aminé N-terminal d'une chaîne peptidique, en utilisant le phénylisocyanate comme réactif.

Le phénylisocyanate (P.I.C.) réagit facilement avec les groupements aminés libres à pH 8 et à 0°C. Le phénylcarbamyl-peptide obtenu, est cyclisé à 100°C pendant une heure en présence d'une solution d'HCl dans l'eau ou dans le méthanol. Le produit de cyclisation obtenu est une 3-phénylhydantoïne.

Le schéma de dégradation est le suivant :



La méthode fut utilisée par ABDERHALDEN et BROCKMAN ( 16 ) en 1930, puis par JENSEN et EVANS en 1935 ( 17 ).

La haute réactivité du phénylisocyanate avec les groupements aminés primaires permet de travailler dans des conditions favorables à la stabilité des protéines. Les produits cyclisés, extraits par l'éther du milieu réactionnel, sont facilement repérés sous rayonnement ultra-violet, ou après chromatographie sur papier d'après ANDERSEN ( 18 ). Cependant, la méthode ne peut être appliquée à l'étude de la séquence N-terminale : les conditions de clivage sont trop drastiques et provoquent l'hydrolyse des liaisons peptidiques, ce qui en interdit l'utilisation comme méthode de dégradation récurrente. Les phénylhydantoïnes obtenues sont d'autre part peu stables et ont tendance à s'hydrolyser.

Cette technique a été complètement abandonnée pour la méthode au fluorodinitrobenzène de SANGER ( 19 ).

## II - METHODE DE DEGRADATION AU CYANATE

En 1963, STARK et SMYTH ( 20 ) réalisent une dégradation sur l'acide aminé N-terminal de chaînes peptidiques, en utilisant l'isocyanate de potassium comme réactif de couplage.

### Technique

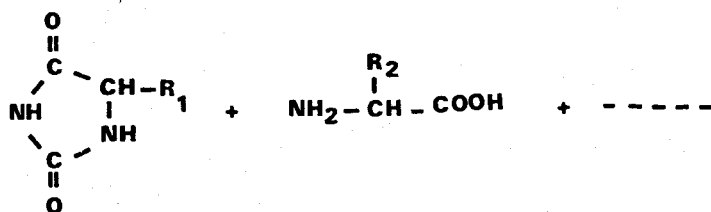
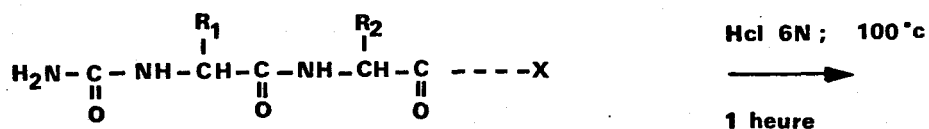
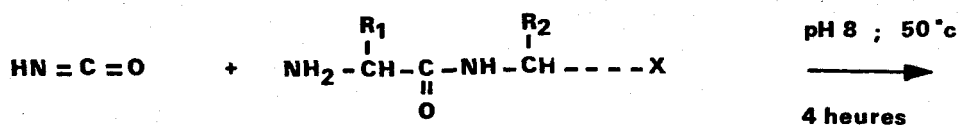
L'isocyanate est ajouté à la protéine en présence d'urée 8 M. La réaction de couplage a lieu à 50°C pendant 4 heures. La cyclisation, réalisée dans HCl 6 N, produit l'hydantoïne.

Les hydantoïnes sont séparées des amino-acides et des peptides par chromatographie d'ions sur colonne Dowex 50 X. L'hydrolyse de ces hydantoïnes régénère l'acide aminé correspondant. Elle peut être effectuée à 110°C dans HCl 6 N pendant 96 heures ou pendant 20 heures dans NaOH 0,2 N.

La méthode est précise mais longue et ne peut servir qu'à déterminer l'acide aminé N-terminal.

La plupart des hydantoïnes sont stables, sauf celles de la thréonine et de la sérine qui sont décomposées.

Le procédé a été souvent utilisé pour étudier la pureté d'une protéine.



### III - METHODE DE DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

En 1950, Pehr EDMAN modifie le procédé de BERGMANN, en remplaçant le phénylisocyanate par le phénylthiocyanate (PITC) ( 21 ) ( 22 ).

La technique prend le nom de dégradation récurrente d'EDMAN.

#### A - La méthode d'Edman

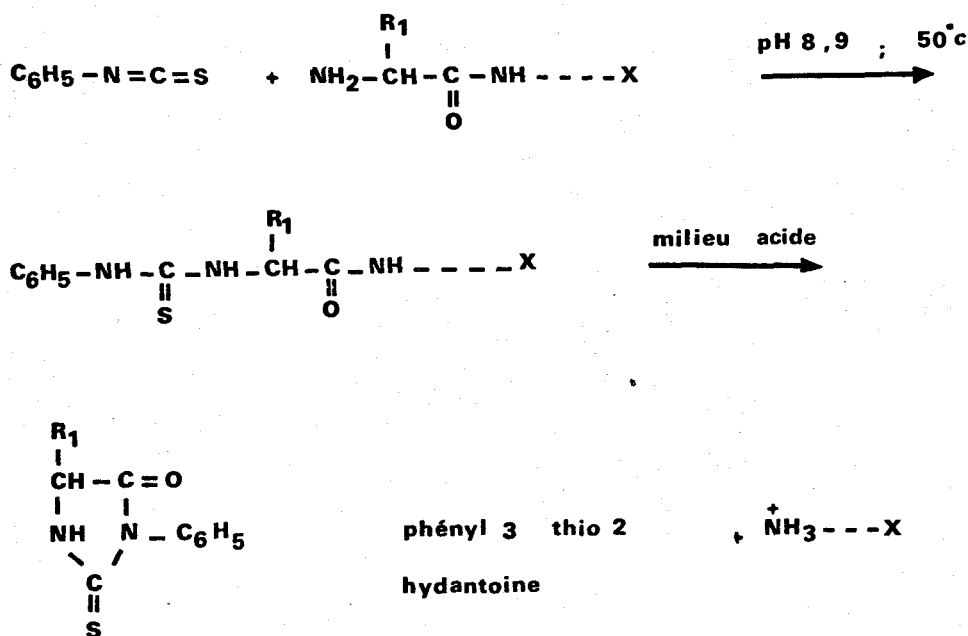
##### 1) Principe

La réaction consiste à faire réagir le phénylthiocyanate (P.I.T.C.) avec la chaîne peptidique à pH 8,9 à 50°C (réaction de couplage). Le composé obtenu est le phénylthiocarbamyl peptide ; ce peptide substitué en présence d'acide se dégrade et libère d'une part un composé cyclique dérivant de l'acide aminé N-terminal, d'autre part, une nouvelle chaîne peptidique : la chaîne peptidique initiale privée de son acide aminé N-terminal. Le nouveau peptide possède un nouveau groupement aminé libre et peut réagir avec le phénylthiocyanate pour être dégradé une deuxième fois.



Pour réaliser la réaction de clivage, EDMAN a d'abord utilisé de l'acide chlorhydrique dans du nitrométhane, en 1953, de l'acide acétique anhydre saturé d'HCl gazeux ( 23 ), puis de l'acide trifluoroacétique ( 24 ). Le composé cyclique a été identifié comme étant une phénylthiohydantoïne.

Les réactions sont les suivantes :



Dans la suite du texte, par souci de simplification, nous appellerons P.T.H. amino-acide, la phényl-3-thio-2-hydantoïne dérivée de l' amino-acide.

## 2) Identification des P.T.H.-amino-acides

### a) La chromatographie sur papier

La première méthode utilisée pour identifier les PTH-amino-acides fut la chromatographie de partage sur papier.

En 1953, puis en 1956 et 1960, EDMAN et SJOQUIST ( 25 ) ( 26 ) ( 27 ) proposent des systèmes de solvants ; leur composition est décrite dans le tableau n° I. Une phase stationnaire est placée dans chaque cuve à chromatographie.

Les taches des PTH-amino-acides sont repérées en lumière ultra-violette, et elles peuvent être découpées, puis éluées par

|     | Composition du solvant   |
|-----|--|
| I   | Heptane - pyridine (70 - 30)   |
| II  | Heptane - n-butanol - solution d'acide formique à 90 % dans l'eau (40 - 20 - 40) |
| III | Heptane - n-butanol - solution d'acide formique à 90 % dans l'eau (40 - 40 - 20) |

TABLEAU n° I (a)

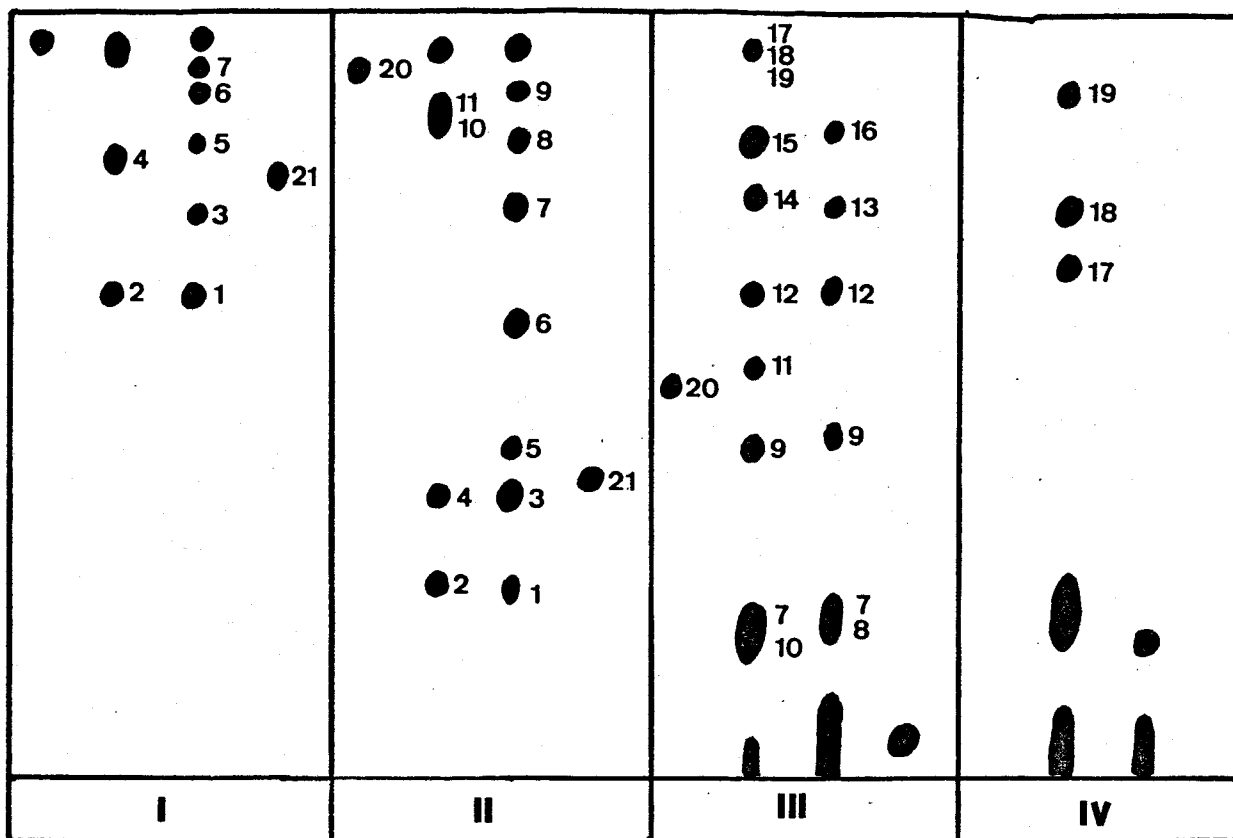
|     | Composition du solvant   | Composition de la phase stationnaire        |
|-----|--|---|
| I   | Heptane-chlorure d'éthylène - acide propionique - solution d'acide formique à 75 % dans l'eau (60-5-5-5) | Solution à 90 % d'acide formique dans l'eau |
| II  | Heptane-chlorure d'éthylène - solution d'acide formique à 75 % dans l'eau (60-30-5)                      | Solution à 90 % d'acide formique dans l'eau |
| III | Heptane-chlorure d'éthylène - solution d'acide formique à 75 % dans l'eau (30-60-5)                      | Solution à 75 % d'acide formique dans l'eau |
| IV  | Heptane-n-butanol - solution d'acide formique à 75 % dans l'eau  | solution à 25 % d'acide formique dans l'eau |

TABLEAU n° I (b)

Systèmes de solvants proposés par SJOQUIST en 1953 (a) ( 28 ), et en 1960 (b) ( 29 ) pour la chromatographie sur papier des PTH-amino-acides.







- |       |                   |                         |
|-------|-------------------|-------------------------|
| 1 leu | 9 gly             | 17 arg                  |
| 2 ile | 10 lys            | 18 his                  |
| 3 val | 11 phenylthiourée | 19 cysSO <sub>3</sub> H |
| 4 pro | 12 tyr            | 20 hydroxyproline       |
| 5 phe | 13 thr            | 21 diphenylthiourée     |
| 6 met | 14 glu            |                         |
| 7 ala | 15 asp            |                         |
| 8 trp | 16 ser            |                         |

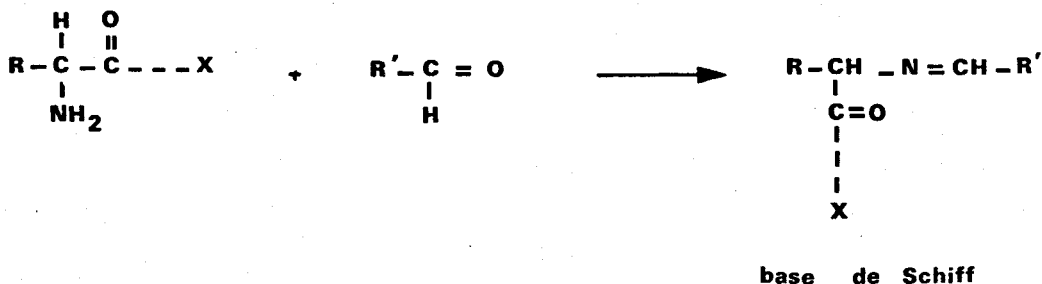
BUS  
LILLE

**Chromatographie des P.T.H. amino acides**  
**sur papier Sjoquist (32 )**

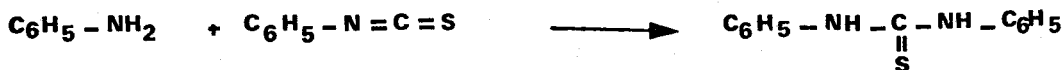
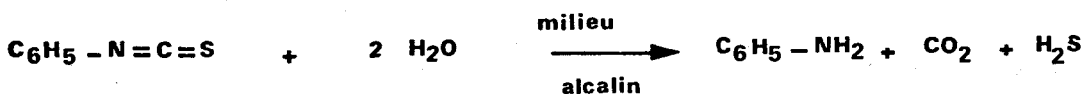
SCHEMA 1



Au départ, les réactions étaient effectuées dans des solvants et tampons non traités, avec des réactifs non purifiés. La présence d'impuretés, notamment d'aldéhydes et d'eau contribue à diminuer considérablement le rendement de chaque réaction : les aldéhydes aliphatiques forment notamment des bases de Schiff avec les amines.



Le phénylisothiocyanate réagit avec l'eau pour former des phényl et diphénylthiourées.



Les coupures de liaisons peptidiques ont été évitées en réalisant séparément les réactions de clivage et de conversion, dans des milieux acides différents.

La chromatographie sur papier s'est révélée être une méthode difficile pour identifier les PTH-amino-acides obtenus, car les solvants employés n'avaient pas été purifiés au préalable, et la séparation obtenue n'était pas satisfaisante.

Elle a dû être complètement abandonnée ; on a dû remplacer provisoirement la méthode d'identification directe par la méthode soustractive, et par la méthode du couplage Edman-dansyl ; actuellement, d'autres méthodes d'identification directe des PTH-amino-acides par chromatographie sur couche mince de gel de silice ou par chromatographie gazeuse s'imposent de plus en plus. Ces améliorations successives apportées dans ces deux domaines ont permis l'élaboration des méthodes modernes de dégradation dont l'aboutissement a été la méthode automatique.

1) Méthodes anciennes de dégradation récurrente

a) Méthodes utilisant l'identification directe des PTH-amino-acides

\* Technique de FRAENKEL-CONRAT en 1955 ( 33 )

Dans la technique de FRAENKEL-CONRAT, les réactions de dégradation ont lieu sur des bandes de papier Whatman n° 1 (1 x 5 cm). La protéine, dissoute dans un mélange d'eau et de dioxane, est déposée sur le papier et y reste pendant les opérations de couplage et de cyclisation. Une solution à 20 p. 100 de P.I.T.C. (\*) dans le dioxane est ajoutée sur la bande de papier. La réaction de couplage est réalisée, après avoir introduit la bande de papier dans un tube contenant un tampon composé de pyridine, de dioxane et d'eau pendant 3 heures à 40°C. Le papier est lavé par trempage dans du benzène et de l'alcool. La réaction de cyclisation est faite dans un tube contenant HCl 6 N à 37°C. L'immersion de la bande de papier dans un mélange d'alcool et d'éther, permet l'extraction du PTH-amino-acide.

Après lavage et séchage, on peut procéder à une nouvelle série de réactions.

Cette technique a donné de bons résultats, elle a été

---

(\*) P.I.T.C. : PhénylIsoThioCyanate

utilisée par HARRIS et LI ( 34 ). Elle assure l'obtention du PTH-amino-acide avec des rendements convenables.

Elle permet surtout d'éviter la précipitation de la protéine : en effet, la dégradation est parfois limitée par le fait que la protéine devient insoluble, donc non réactive, après quelques cycles ; fixée sur la bande de papier, elle continuera à réagir même si ses propriétés physiques changent.

En 1967, SCHROEDER ( 35 ) a adapté la méthode de FRAENKEL-CONRAT à la dégradation des peptides. La technique a encore été employée récemment par HORECKER et coll. ( 36 ).

#### \* Technique de MARGOLIASH - 1962 ( 37 )

MARGOLIASH effectue la réaction de couplage dans un tampon volatil, facilement éliminable, composé d'une solution à 25 p. 100 de triméthylamine dans l'eau et dans lequel le P.I.T.C. et le peptide sont solubles. La réaction de cyclisation est réalisée dans un mélange acide acétique-HCl concentré (5/1).

Après chaque dégradation, une partie du peptide résiduel est prélevé et soumis à une hydrolyse totale acide ou enzymatique, suivie d'une analyse d'acides aminés. La composition en acides aminés du peptide résiduel révèle la disparition d'un résidu d'acide aminé, qui correspond au P.T.H. amino-acide formé à chaque étape et identifié par chromatographie sur papier. La technique de MARGOLIASH a été utilisée récemment par TAKAHASHI ( 38 ).

L'utilisation d'un tampon dans lequel le réactif et la protéine sont parfaitement solubles permet au milieu de réaction d'être homogène, donc à la réaction d'être plus complète, avec une quantité plus faible de peptide initial.

Le milieu acide fort, mais non anhydre de la réaction de cyclisation a pour inconvénient majeur de provoquer des coupures gênantes de liaisons peptidiques et de limiter très vite la dégradation.

#### b) Méthodes de dégradation soustractive

##### \* Principe

Au lieu d'identifier les PTH-amino-acides obtenus après chaque dégradation, KONIGSBERG et HILL ( 39 ) ont repris l'idée de MARGOLIASH et ont préféré soumettre une partie du peptide résiduel à une hydrolyse totale et procéder ainsi à une analyse quantitative des acides aminés.



D'autres chercheurs ont employé cette technique dite de dégradation soustractive.

\* Technique de KONIGSBERG et HILL en 1962 ( 40 )

Le peptide est dissous dans un tampon composé de N-éthylmorpholine, d'acide acétique, d'éthanol et d'eau.

La réaction de cyclisation a lieu dans de l'acide trifluoroacétique anhydre pendant 1 heure à 50°C. Le peptide dégradé est purifié par passage sur une colonne de résine Dowex 50 X 2, puis récupéré. Une fraction du peptide recueilli est hydrolysée et le reste soumis au cycle de dégradation suivante.

TRAVIS et LIENER ( 41 ) ont préféré au passage sur résine l'électrophorèse à haute tension sur papier comme méthode de purification du peptide, car si celui-ci est trop acide, il n'est pas retenu par la résine.

L'avantage de cette technique consiste dans l'emploi d'un acide fort anhydre, volatil, donc facilement éliminable. Cette amélioration assure une coupure quantitative et spécifique de la première liaison peptidique de la chaîne, du côté N-terminal.

\* Technique de DOPHEIDE, STEIN, MOORE ( 42 )  
en 1967

Les réactions sont effectuées dans un tube rodé, le tampon de couplage est composé de pyridine, de N-éthylmorpholine et d'acide acétique (pH 8,5). Après addition de réactif, le tube est chaque fois purgé par de l'azote afin d'éviter les oxydations possibles et gênantes au moment du couplage.

\* Technique d'ELZINGA, de LAI et d'HIRS ( 43 ) ( 44 )  
en 1968

Une quantité connue de peptide est dissoute dans une solution à 30 p. 100 d'acide acétique. Plusieurs fractions de cette solution contenant chacune 100 nanomoles de peptide, sont placées dans des tubes rodés (le nombre de tubes dépend du nombre de dégradations désirées). Les tubes sont disposés dans une chambre de réaction, fixés sur un bloc d'aluminium. Leur contenu est séché, le P.I.T.C. et le tampon de couplage (solution à 25 p. 100 de triméthylamine dans l'eau) sont ajoutés et la dégradation commence.

ELZINGA, LAI et HIRS appliquent l'idée de EDMAN (45) et réalisent séparément la réaction de clivage et la réaction de conversion. Ils emploient l'acide trifluoroacétique rigoureusement anhydre, pendant 20 minutes, sous azote à 40°C, pour transformer le phényl-carbamyl-peptide en thiazolinone.

L'acide trifluoroacétique est éliminé sous vide, à la fin de la réaction, le tube (1) est prélevé et une nouvelle dégradation a lieu sur les autres tubes. Dans le tube (1), la thiazolinone est extraite et convertie en PTH-amino-acide en présence d'acide chlorhydrique à 40°C pendant une heure et demie.

En 1968, ELZINGA, LAI et HIRS paraissent avoir réuni de bonnes conditions pour dégrader un peptide ou une protéine. Ils emploient un tampon de couplage volatil, ils séparent la réaction de clivage et la réaction de conversion, et ils réalisent la réaction de clivage dans un milieu rigoureusement anhydre.

En outre, ils procèdent à une nouvelle tentative d'identification directe des PTH-amino-acides qui se révèle indispensable.

En effet, la méthode soustractive est indiscutablement plus précise que la méthode d'identification directe des produits de réaction. Cependant, elle ne permet pas de déterminer certains acides aminés détruits au cours de l'hydrolyse (par exemple, la glutamine, le tryptophane, l'asparagine) à moins d'effectuer une hydrolyse enzymatique totale sur le peptide résiduel, au lieu d'une hydrolyse acide totale. Elle donne des résultats certains pour les premières dégradations ; au-delà, elle laisse des ambiguïtés.

WU et coll. (46) ont pratiqué cette méthode. D'après le tableau II, la séquence, déterminée après dosage des acides aminés dans le peptide résiduel, à la fin de chaque dégradation, est facilement accessible pour les 6 premiers acides aminés. Le résultat devient discutable, dès la 7ème étape (différence de 0,37 mole dans les dosages), et à partir de ce moment, la méthode soustractive ne peut donc plus servir de méthode d'identification.

#### C) Méthode utilisant la régénération des acides aminés

\* Technique de DELANGE, SMITH (48) (49) en 1968 et 1969

La conversion de la thiazolinone en PTH-amino-acide est

| Peptide initial      |      | Dosage des acides aminés après hydrolyse du peptide après les dégradations |             |             |             |             |      |             |             |             |             |      |             |
|----------------------|------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|
|                      |      | 1  | 2           | 3           | 4           | 5           | 6    | 7           | 8           | 9           | 10          | 11   | 12          |
| Arg                  | 1,00 | N.D.   | N.D.        | N.D.        | N.D.        | N.D.        | N.D. | N.D.        | N.D.        | 1,00        | 1,00        | 1,00 | 1,00        |
| Asx                  | 1,00 | <u>0,07</u>  | 0,06        | 0,04        |             |             |      |             |             |             |             |      |             |
| CysSO <sub>3</sub> H | 2,20 | 2,19   | 2,17        | 2,11        | 2,18        | 2,11        | 1,97 | <u>1,60</u> | 1,40        | 1,49        | 1,47        | 1,39 | 1,40        |
| Glx                  | 2,25 | 2,16   | 2,08        | 2,08        | 2,08        | 2,06        | 1,95 | 1,93        | <u>1,49</u> | 1,35        | 1,22        | 1,02 | 1,00        |
| Gly                  | 4,28 | 4,12   | 4,00        | 4,00        | 4,00        | 4,00        | 4,00 | 4,00        | 4,00        | 4,00        | <u>3,76</u> | 3,85 | 3,80        |
| Leu                  | 1,05 | 1,00   | 0,91        | <u>0,14</u> |             |             |      |             |             |             |             |      |             |
| Lys                  | 1,08 | N.D.   | N.D.        | N.D.        | N.D.        | N.D.        | N.D. | N.D.        | N.D.        | 0,81        | 0,78        | 0,78 | <u>0,58</u> |
| Pro                  | 3,15 | 3,19   | 3,06        | 2,92        | <u>2,34</u> | 2,13        | 1,41 | 1,22        | 1,22        | 1,28        | 1,22        | 1,02 | 1,03        |
| Ser                  | 2,88 | 2,82   | 2,60        | 2,68        | 2,63        | <u>2,01</u> | 1,87 | 1,78        | 1,73        | <u>1,43</u> | 1,40        | 1,32 | 1,30        |
| Tyr                  | 0,91 | 0,81   | <u>0,03</u> | 0,03        |             |             |      |             |             |             |             |      |             |

Séquence du peptide

OT 4 (I) : Asx - Tyr - Leu - Pro - Ser - Pro - CysSO<sub>3</sub>H - Glx - Ser - Gly - Glx - Lys

N.D. : non déterminé

TABLEAU n° II

(d'après WU et coll. 47 )



réalisée dans un mélange d'acide acétique glacial et d'HCl concentré (5/1) à 40°C pendant 1 heure.

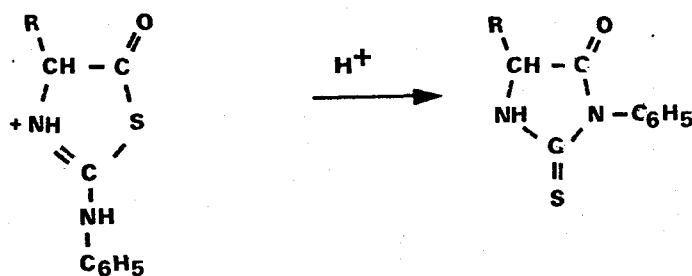
L'acide aminé est régénéré à partir du PTH-amino-acide par une hydrolyse acide totale en milieu HCl 6 N à 150°C pendant 16 heures. Il est identifié après électrophorèse haute tension, ou par analyse automatique.

Nous verrons dans le paragraphe suivant les avantages et les inconvénients de cette méthode de régénération des acides aminés à partir des PTH-amino-acides.

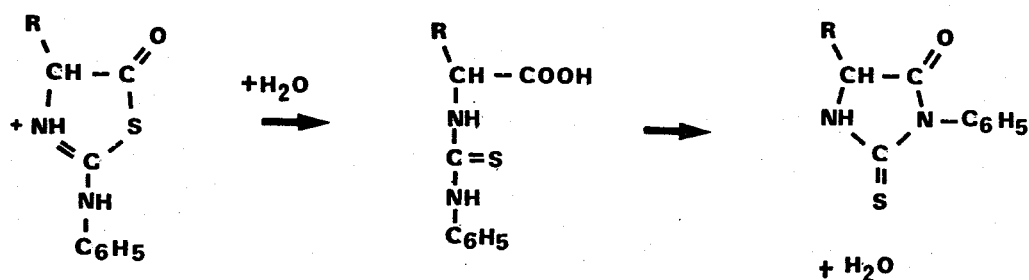
## 2) Méthodes modernes de dégradation récurrente

Les dernières améliorations dans le domaine de la dégradation récurrente consistent essentiellement en une mise au point de la réaction de conversion, grâce à EDMAN et ILSE (50) (51) et finalement à l'automatisation de la technique.

En milieu acide fort anhydre, la réaction de conversion est considérée comme un réarrangement intramoléculaire.



En milieu acide dilué, la conversion se fait en deux étapes : hydrolyse de la thiazolinone en phénylthiocarbonyl amino-acide, suivie de la cyclisation de l'acide en PTH-amino-acide



Une autre méthode : le couplage Edman-dansyl présente également de l'intérêt.

\* Technique de NIALL et d'EDMAN (52 )

Le tampon de couplage utilisé est composé de pyridine, de diméthylallylamine et d'eau (15, 12, 10 (V/V/V)). NIALL et EDMAN réalisent la réaction de clivage en milieu acide trifluoroacétique anhydre, et la conversion de la thiazolinone en PTH-amino-acide , en milieu acide dilué.

D'autres expériences ont permis de modifier les conditions opératoires, en particulier de réduire les temps de réaction, en élevant la température.

TABLEAU III

|                | REACTION DE CLIVAGE                |                   | REACTION DE CONVERSION           |  |
|----------------|------------------------------------|-------------------|----------------------------------|--|
|                | 40°C sous atmosphère d'azote       |                   | 80°C sous atmosphère d'azote     |  |
|                | Quantité d'acide trifluoroacétique | Temps de réaction | Quantité d'acide chlorhydrique N | Temps de réaction                        |
| 1ère technique | 50 µl                              | 20'               | 300 µl                           | 15'                                      |
| 2ème technique | 100 µl                             | 7'                | 200 µl                           | 10'<br>8' (pour PTH-sérine et thréonine) |

Initialement, NIALL et EDMAN ont utilisé pour identifier les PTH-amino-acides les 3 systèmes suivants proposés par SJOQUIST en 1956, en chromatographie sur papier.

Composition des 3 systèmes

Système D : Xylène/formamide

Système E : n-butyl-acétate/acide propionique/formamide (60/1,8/8)

Système F : n-heptane/chlorure d'éthylène/acide formique (1/2/2)

La deuxième technique est pratiquée à MARSEILLE par ROCHAT (53) ; elle a permis à KOPEYAN d'identifier 18 acides aminés de la neurotoxine de scorpion. LAURENT-TABUSSE (54) a fait 10 dégradations sur les peptides tryptiques de l'anhydrase carbonique.

SORM (55), en Tchécoslovaquie, EAKER, en Suède (56), PECHERE à Montpellier (57), IWANAGA et coll. (58) (pour déterminer la structure primaire du fibrinogène humain) ont également utilisé cette technique.

\* Technique d'EDMAN et BEGG en 1967 (59)

La technique proposée par EDMAN et BEGG en 1967, est automatique, mais il est possible de la transposer en procédé manuel.

L'acide heptafluorobutyrique remplace l'acide trifluoroacétique, comme réactif de clivage. C'est également un acide fort, mais sa pression de vapeur est plus basse que celle de l'acide trifluoroacétique, ce qui permet de réduire les pertes dues à l'évaporation. Pour les mêmes raisons, le quadrol ou NNN'N' tétra (2-hydroxypropyl) éthylène-diamine remplace le diméthylallylamine ; son utilisation assure un milieu rigoureusement anhydre pour la dégradation. L'étude de la méthode automatique sera l'objet de notre deuxième chapitre.

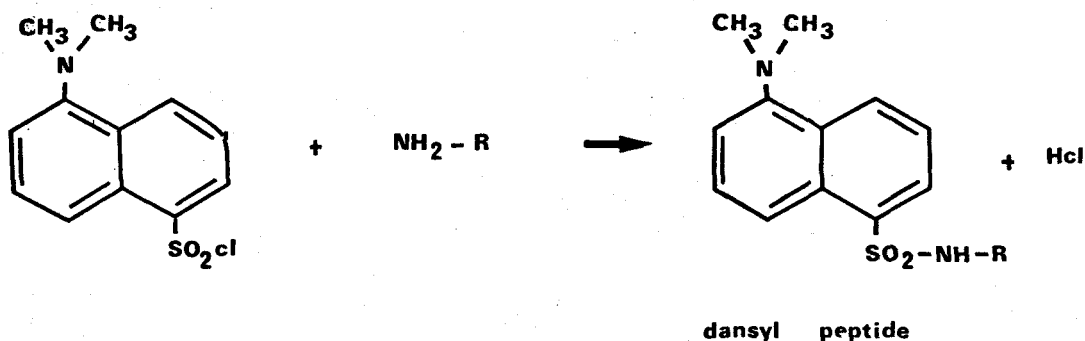
\* Méthode de couplage Edman-Dansyl-Dansylation

- Principe de la méthode de GRAY et HARTLEY (60)

La fonction aminée de l'acide N-terminal du peptide réagit en milieu alcalin avec le chlorure de dansyl (\*). Le dansyl peptide obtenu, libère par hydrolyse acide, un dansyl amino-acide fluorescent en lumière ultra-violette.

---

(\*) Chlorure de l'acide diméthyl amino 1-naphtalène sulfonique 5.



Parallèlement, on dégrade le peptide pour provoquer la rupture de la liaison peptidique N-terminale. Le peptide résiduel, séparé de la thiazolinone formée est à nouveau utilisé pour une autre étape ultérieure, quand son acide aminé N-terminal a été identifié par la méthode des dansyls-amino-acides.

- Protocole expérimental (voir Chapitre technique)

L'intérêt majeur de cette technique réside dans le fait qu'une très faible quantité de peptide (40 nanomoles) est nécessaire pour établir la séquence.

L'identification est facile par chromatographie sur couche mince de silice, ou mieux sur feuille de polyamide.

### C - METHODES D'IDENTIFICATION MODERNES DES PTH-AMINO-ACIDES

Il existe actuellement de nombreuses méthodes pour identifier les PTH-amino-acides. La chromatographie sur couche mince est réalisée sur silica gel et sur polyamide. La chromatographie en phase gazeuse s'est considérablement développée depuis 1969, et remplace définitivement la chromatographie sur papier pour les études quantitatives.

La spectrométrie de masse a été adaptée à la séparation des PTH-amino-acides et représente peut-être la technique d'avenir.

#### 1) Chromatographie sur couches minces de silica gel (support de verre)

En 1956, EDMAN et SJOQUIST ( 61 ) ont proposé des systèmes de solvants, qui ont d'abord été utilisés en chromatographie sur

papier, puis adaptés à la chromatographie sur couche mince.

Système D : Xylène/Formamide

La plaque de silica gel est trempée dans un mélange fraîchement préparé d'acétone et de formamide (3/7) pendant une minute, puis séchée à l'air quelques minutes.

La migration se fait dans du xylène pur.

Système E : n-butyl acétate/acide propionique/formamide

EDMAN propose de tremper la plaque dans du formamide, comme pour le système D. On ajoute 1,8 ml d'acide propionique à 60 ml d'acétate de butyle saturé d'eau, et 8 ml de formamide au mélange.

Seule, la phase supérieure est récupérée. La cuve à chromatographie est équilibrée 1/2 heure avant d'être utilisée.

Système H ( 62 ) : Chlorure d'éthylène/Acide acétique (60/14)

Les résultats obtenus par EDMAN sont reproduits sur le schéma n° 2.

## 2) Chromatographie sur couches minces de silica gel (support de plastique)

La chromatographie sur couches minces de silica gel (support de plastique) a été employée par TADASHI INAGAMI et KAZUO MURAKAMI ( 63 ) dans les systèmes solvants suivants :

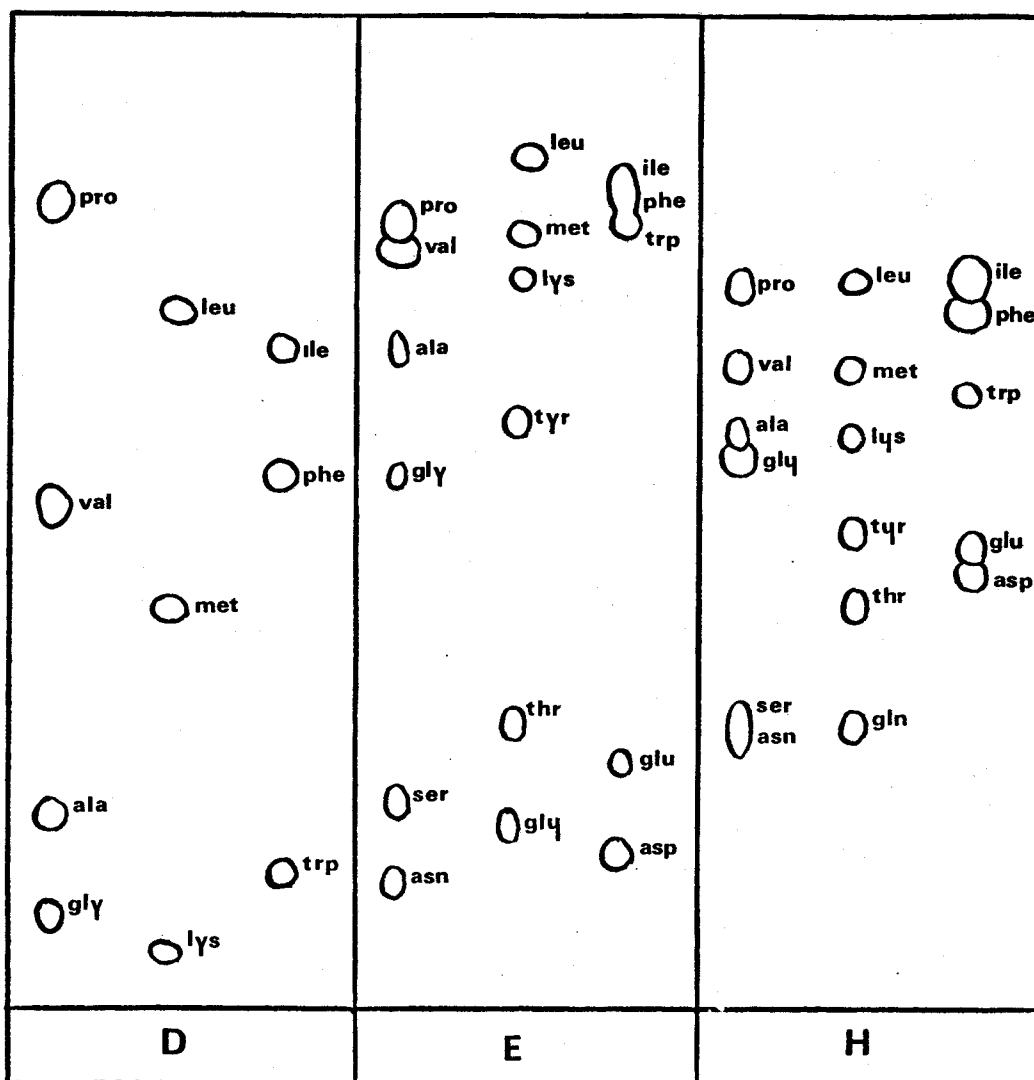
Système 1 : Xylène/Méthanol (80/10)

Système 2 : Xylène/Isopropanol (70/20)

Système 3 : Acétate de butyle saturé en eau (80/3)/formamide/  
acide propionique/eau (1/5/1,5).

Nous avons utilisé ce procédé d'identification sur silica gel et support plastique, dans les systèmes de solvant proposés par EDMAN, que nous avons modifié pour obtenir une bonne séparation. Nous exposerons nos résultats dans le paragraphe V.





**D** XYLENE - FORMAMIDE

**E** ACETATE DE BUTYLE - ACIDE PROPIONIQUE - FORMAMIDE (60-1,8-8)

**H** CHLORURE D'ETHYLENE - ACIDE ACETIQUE (60 - 14)

**CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE  
SILICA GEL DES P.T.H. AMINO-ACIDES  
D'APRES EDMAN**



3) Identification des PTH-arginine, histidine, acide cystéique

Les PTH-arginine, histidine et acide cystéique ne sont pas solubles dans les solvants organiques. EDMAN ( 64 ) a proposé une électrophorèse dans un tampon phosphate 0,02 M de pH 6,2 pour séparer le PTH acide cystéique du PTH histidine. LIGHT, GLAZER et SMITH ( 65 ) ont utilisé le système pyridine/acide acétique de pH 6,4 pour séparer par électrophorèse le PTH acide cystéique du PTH arginine.

4) Chromatographie sur couches minces de polyamide

La chromatographie sur couches minces de polyamide a été réalisée par KLAUSS D. KULBE ( 66 ) en une et deux dimensions.

Nous avons employé des plaques (20 x 20 cm) de verre recouverte de polyamide G 1600 (Schleicher et Schüll) sans indicateur de fluorescence. Nous avons utilisé les 6 systèmes de solvants proposés par KULBE:

Système 1 : toluène/n-pentane/acide acétique (60/30/35) (v/v/v)

Système 2 : chlorure d'éthylène/acide acétique (85/20)

Système 3 : toluène/n-pentane/acide acétique (60/30/20)

Système 4 : tétrachlorure de carbone/acide acétique (80/30)

Système 5 : solution à 35 p. 100 d'acide acétique dans l'eau

Système 6 : solution à 30 p. 100 d'acide acétique dans l'eau.

avec les solvants suivants :

Acide acétique (R.P. Carlo Erba), toluène (R.P. Carlo Erba), n-pentane (pour analyses - Merck), chlorure d'éthylène (Fluka), tétrachlorure de carbone (Prolabo pour analyses)

Les PTH-amino-acides (Pierce Chemical Society) sont dissous dans de l'acétate d'éthyle pur (2 mg/ml) et conservés au froid, à l'obscurité.

Les cuves à chromatographie sont tapissées intérieurement de papier filtre imprégné de solvant, et équilibrées pendant 48 heures au moins, à 25°C.

La migration dans chacun des systèmes varie de 50 à 90 minutes. Sortie de la cuve, la plaque est bien séchée à température ambiante, puis mise 5 minutes à 110°C. Quinze minutes après la sortie de l'étuve, elle peut être observée sous lumière ultra-violette (254 Å).

Les PTH-amino-acides apparaissent sous forme de taches violet foncé sur un fond plus clair.

Les résultats sont reproduits sur les schémas 3, 4, 5, 6, 7.

La différenciation des PTH Pro et Val est nette dans chaque système, de même que celle de Val, Phe dans les systèmes 3, 4, 5, 6, de Met-Phe dans les systèmes 4, 5, 6 et de Trp-Thr et Glu dans les systèmes 2, 5 et 6.

Les PTH Ile et Leu sont bien séparés dans le système 5.

Cependant, le polyamide est plus fragile que le silica gel : il est difficile d'entourer les taches au crayon sans abimer le gel. L'observation sous lumière ultra-violette est plus difficile sur les plaques de polyamide que sur les plaques de silica gel.

Cette technique de chromatographie a l'avantage de faire migrer les PTH arginine et histidine.

\* Microméthode d'identification des PTH-amino-acides sur plaques de polyamide

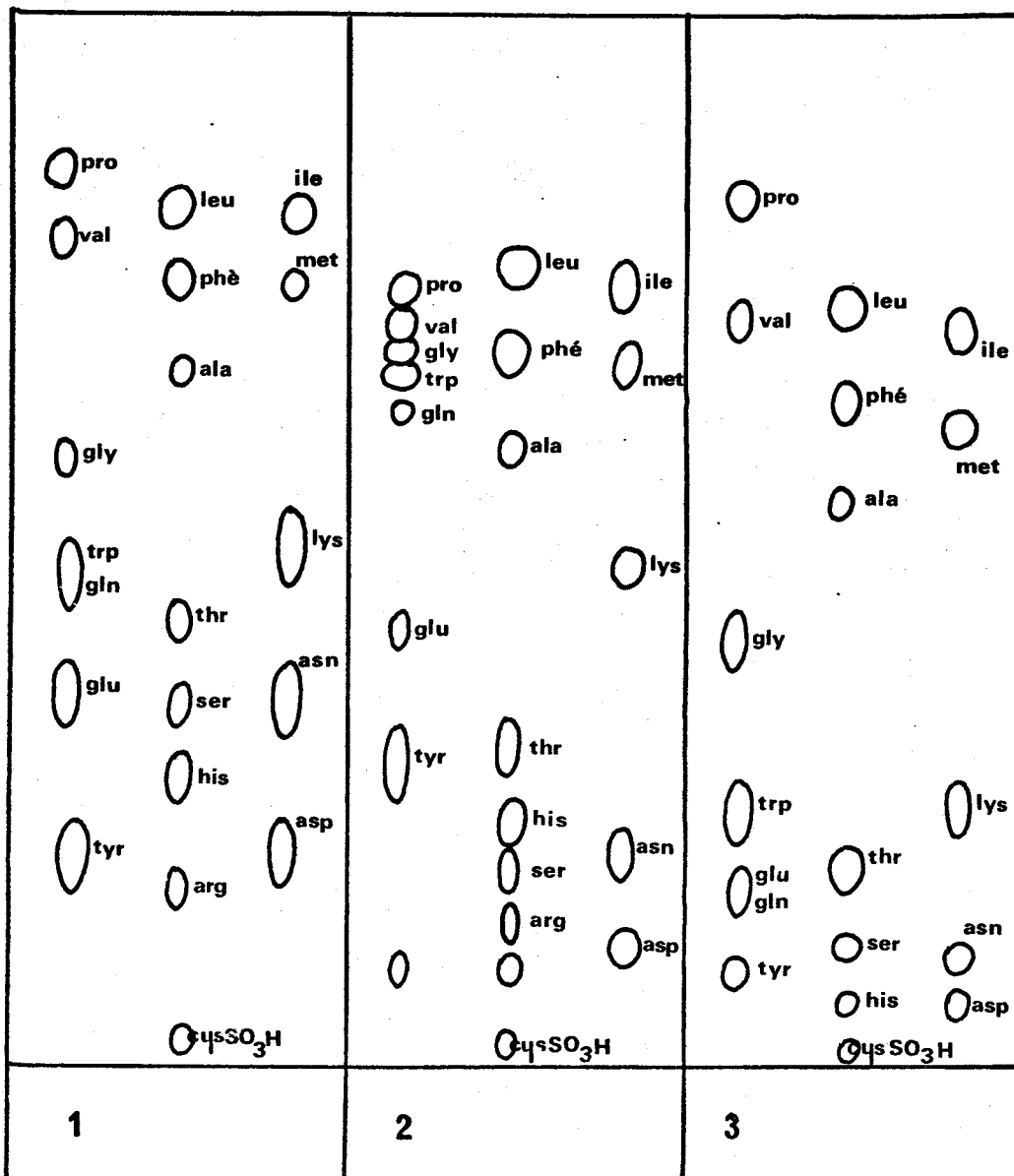
Cette technique est comparable à celle utilisée pour l'identification des dansyl-amino-acides. Elle a été récemment mise au point par SUMMER et SMYTHERS ( 67 ), avec des plaques (5 x 5 cm) recouvertes de polyamide sur les deux faces (Gallard Schlesinger, Carle Place, New-York), dans les systèmes de solvants proposés par KULBE ( 68 ).

Un indicateur de fluorescence est dissous dans le premier solvant de chromatographie.

Cette technique a l'avantage d'être très sensible : 0,05 nmole de PTH-amino-acide est nécessaire pour l'identification, au lieu de 5 à 10 nmoles sur les plaques de polyamide ordinaires. La migration est très rapide (moins de 30 minutes pour les deux dimensions).

##### 5) Chromatographie en phase gazeuse

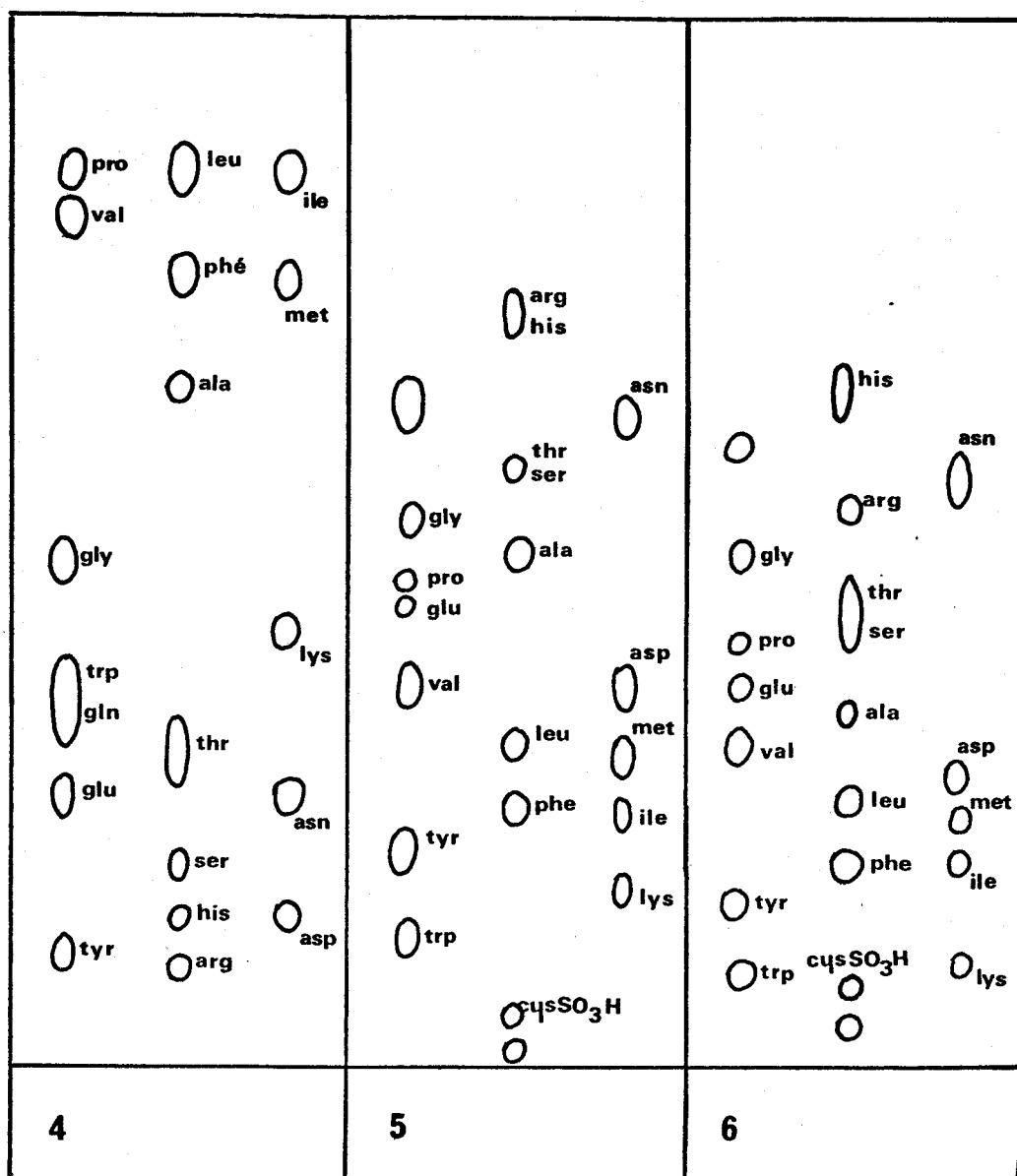
PISANO et BRONZERT ( 69 )(70 ) ont mis au point plusieurs systèmes de séparation des PTH amino-acides en phase gazeuse. Seul, le PTH arginine n'a pu être identifié par cette méthode. Deux systèmes, proposés par PISANO et BRONZERT ( 71 ) ont été utilisés au laboratoire, et ont donné des séparations peu satisfaisantes.



- 1 : TOLUENE - PENTANE - ACIDE ACETIQUE (60 - 30 - 35 )
- 2 : CHLORURE D'ETHYLENE - ACIDE ACETIQUE (90 - 16 )
- 3 : TOLUENE - PENTANE - ACIDE ACETIQUE (60 - 30 - 20 )

**CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE  
POLYAMIDE DES P.T.H. AMINO ACIDES**





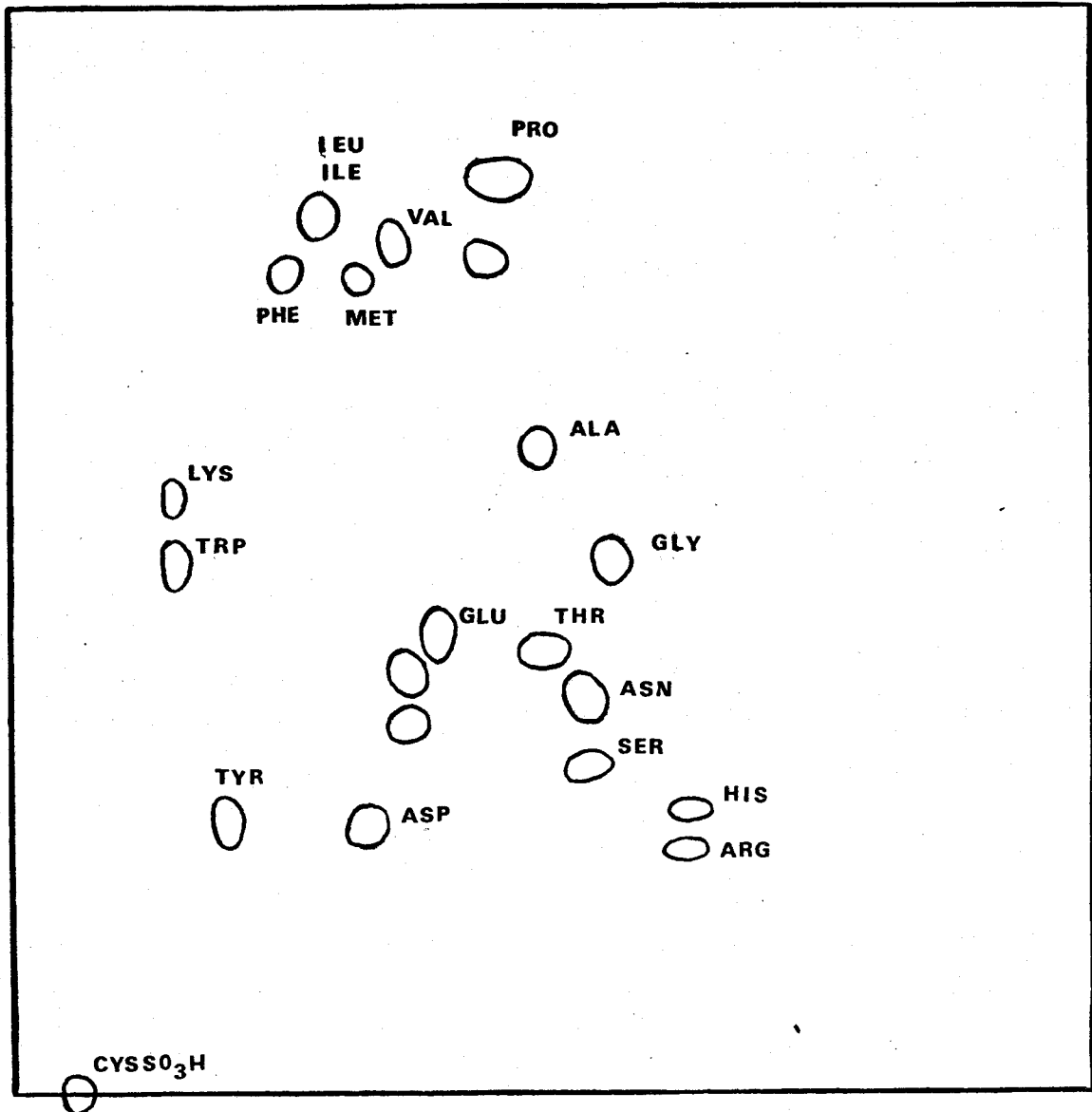
**4** : TETRACHLORURE DE CARBONE -- ACIDE ACETIQUE ( 80 - 30 )

**5** : 35% D' ACIDE ACETIQUE

**6** : 30% D' ACIDE ACETIQUE

**CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE  
POLYAMIDE DES P.T.H. AMINO ACIDES**



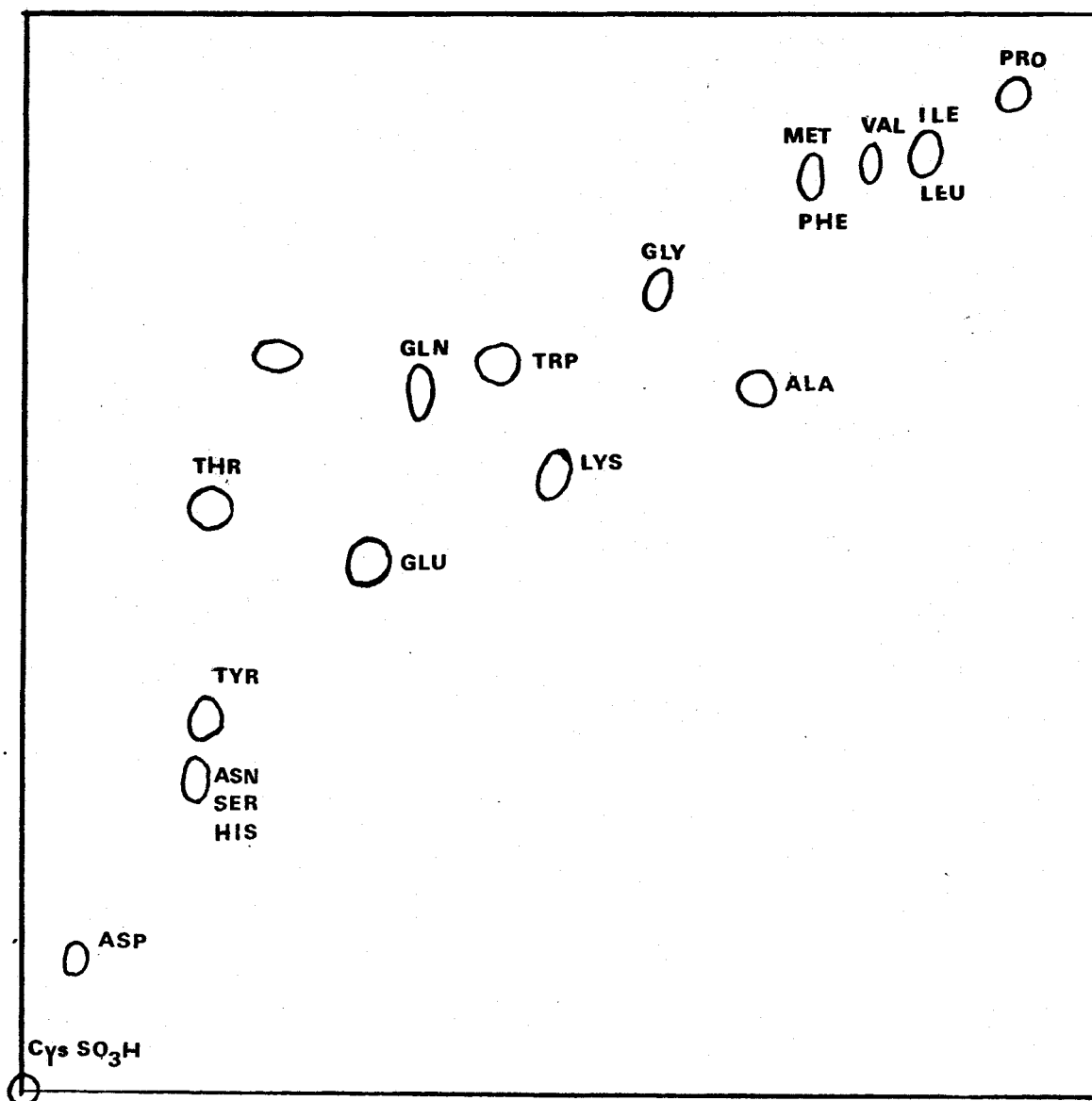


2 → 35 % D'ACIDE ACETIQUE

1: TOLUENE - PENTANE - ACIDE ACETIQUE ( 60 - 30 - 35 )

**CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR  
COUCHE MINCE DE POLYAMIDE des  
P.T.H. amino . acides**



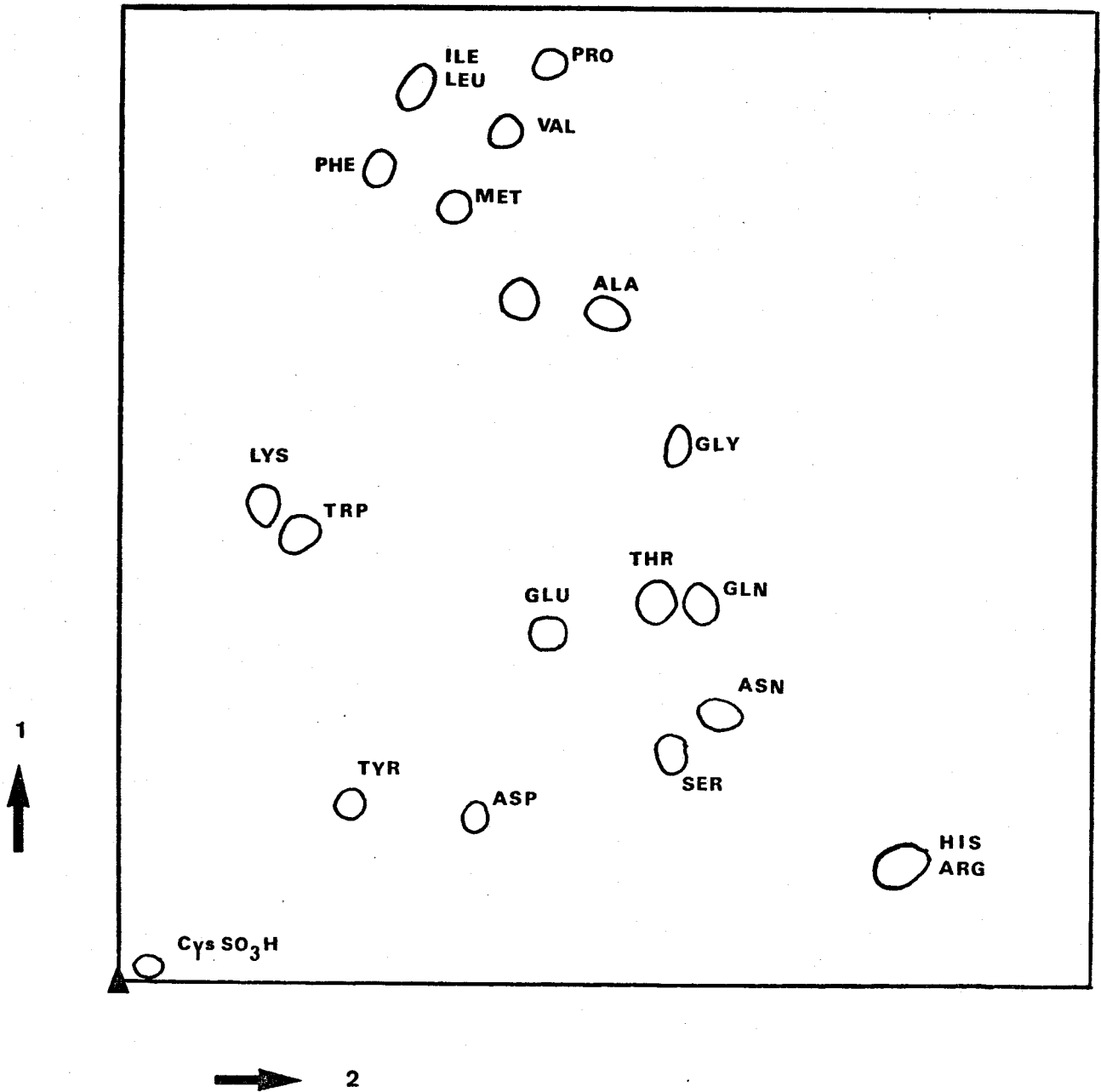


1 : CHLORURE D'ETHYLENE - ACIDE ACETIQUE ( 90 - 16 )

2 : TOLUENE - PENTANE - ACIDE ACETIQUE ( 60 - 30 - 20 )

**CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR  
COUCHE MINCE DE POLYAMIDE DES  
P.T.H. AMINO . ACIDES**





1 :  $\text{Ccl}_4$  - ACIDE ACETIQUE ( 80 - 30 )

2 : 30 % D'ACIDE ACETIQUE

**CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR**

**COUCHE MINCE DE POLYAMIDE DES**

**P-T-H. AMINO - ACIDES**





Le premier est constitué de deux plaques stationnaires complémentaires :

- une phase constituée de silicone D.C. 560 employée pour identifier les PTH amino-acides les plus volatils et les moins polaires ;
- une phase constituée de silicone X.E.60 employée pour identifier les moins volatils et les plus polaires.

Le deuxième système décrit par les mêmes auteurs en 1972 est constitué d'une phase stationnaire unique faite de silicones S.P.400, O.V. 210 et O.V. 225 (C.F.C.)

Un troisième système, ayant pour phase stationnaire le mélange de silicone D.C. 560, X.E. 60, O.V. 22 (D.X.O.) a été employé avec succès pour identifier les PTH amino-acides (Schéma n° 8 ).

Un autre système a été préconisé par la Société JEOL ( 73 ). Nous décrirons cette technique dans le paragraphe V.

Une bonne séparation des PTH isoleucine et leucine a été obtenue, avec la phase stationnaire S.E. 30 (Schéma n° 9 ).

L'avantage de la technique de chromatographie en phase gazeuse est d'utiliser très peu de PTH-amino-acides pour l'identification : la quantité nécessaire est de l'ordre du  $\mu\text{g}$ . Elle permet d'étudier quantitativement le rendement de chaque dégradation, au cours d'une détermination de séquence, de façon plus précise et plus rapide que la chromatographie sur papier.

De nombreux chercheurs utilisent la chromatographie en phase gazeuse comme moyen d'identification et de séparation des PTH amino-acides. Par exemple, BRANDT et Von HOLT ( 74 ) l'ont employé pour déterminer la structure primaire complète de l'histone F<sub>3</sub> des érythrocytes de Poulet ; INMANN, HANNON et APPELA ( 75 ) s'en sont servi pour obtenir la séquence des chaînes d'immunoglobulines de souris.

#### 6) La spectrométrie de masse

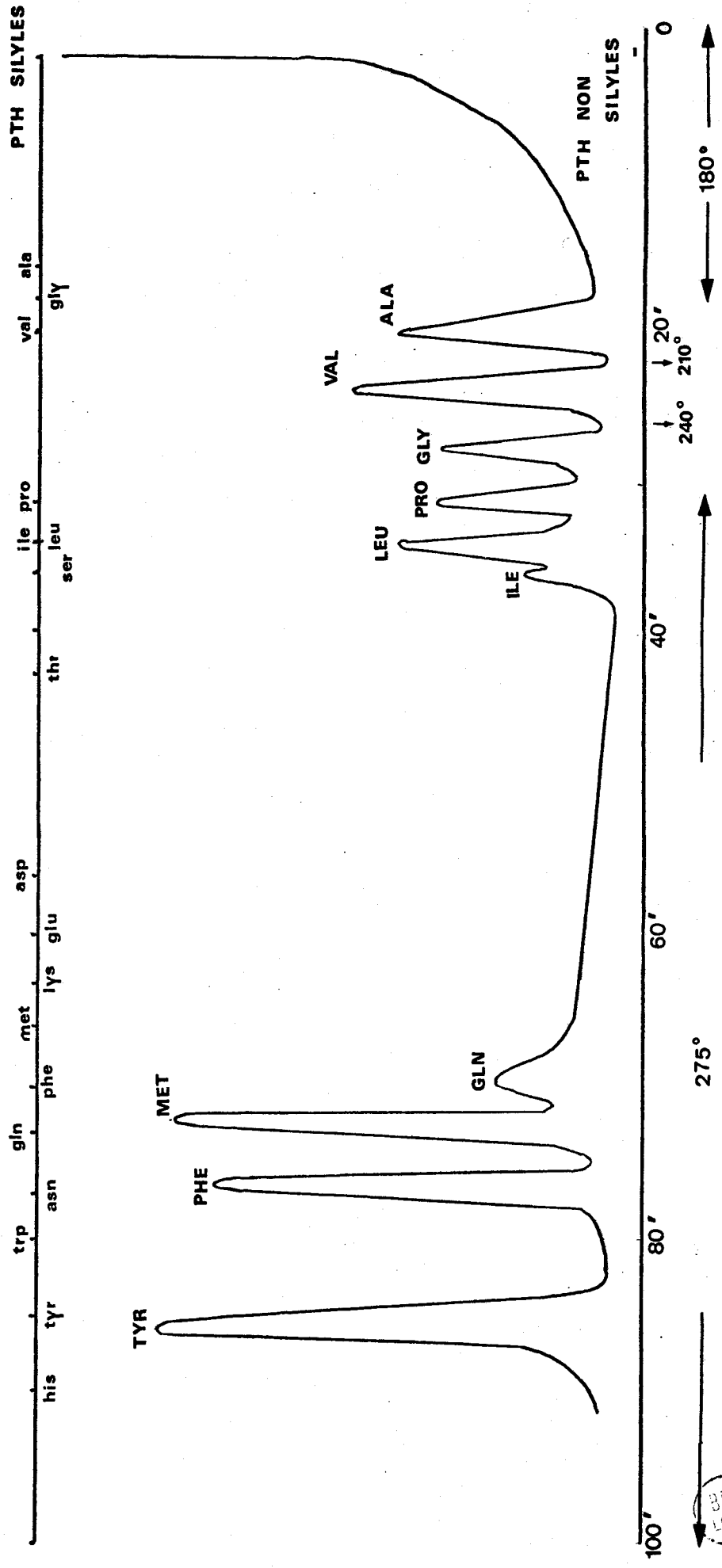
La spectrométrie de masse a également été préconisée, nous n'avons pu l'utiliser comme méthode d'identification des PTH amino-acides, car l'appareillage est compliqué et coûteux, et la technique très spéciale.

COLONNE D.X.O , chromosorb W 100 ,120 mesh

pression H2 : 1 bar  
air : 1,5 bar

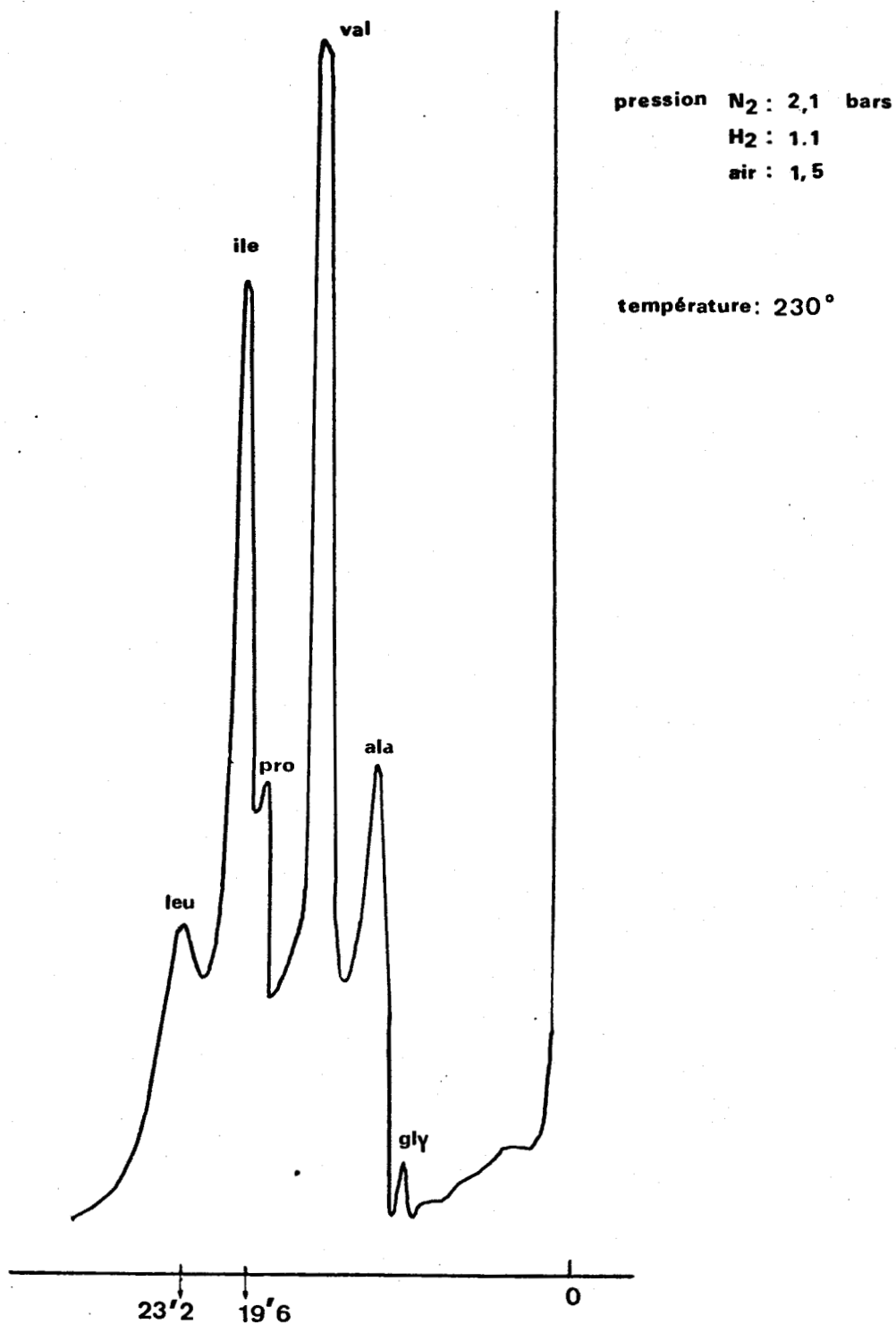
débit de N2 : 95 ml/mm

quantité de PTH injectée : 2 à 10 µg



BUS  
LILLE

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES PTH amino acides - technique de PISANO et BRONZERT (72) modifiée



SEPARATION PTH LEU ET ILE EN CHROMATOGRAPHIE  
EN PHASE GAZEUSE - COLONNE SE 30



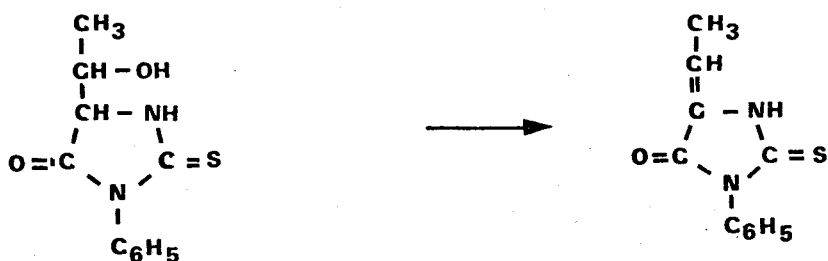
Les spectres de masse des méthyl et des phénylthiohydantoïnes amino-acides ont été étudiés par HAGENMAIER ( 76 ) et coll., FAIRWELL et coll. ( 77 ) en 1970.

Le principe de cette méthode consiste à produire des ions à partir des PTH-amino-acides et à séparer ceux-ci en fonction du rapport  $\frac{m}{e}$  (m étant la masse de l'ion et e sa charge électrique). Plusieurs procédés sont employés pour former les ions. On peut utiliser, sous vide poussé, un bombardement électronique ou réaliser une ionisation chimique.

Des transitions interviennent dans ces spectres de masse. Elles ont été décrites par SUN et LOVIN ( 78 ) et proviennent de fragmentation des PTH-amino-acides ; ces réactions de scission et les transitions qui en résultent peuvent contribuer à l'identification, car elles sont spécifiques à chaque PTH amino-acide.

#### 7) La régénération des acides aminés

La régénération des acides aminés par hydrolyse acide ou alcaline des PTH correspondants, exige des conditions rigoureuses qui provoquent la destruction de certains acides aminés. La sérine et la thréonine sont décomposées par déshydratation, selon la réaction suivante :



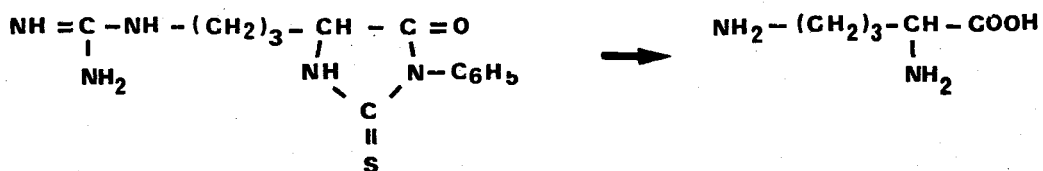
PTH thréonine

PTH déhydrothréonine

Le noyau indole du tryptophane est détruit ; la glutamine et l'asparagine sont transformées en acides dicarboxyliques correspondants.

L'hydrolyse peut être faite avec l'hydroxyde de baryum 0,25 N à 140°C pendant 48 heures (EDMAN - 79 ). Tous les acides aminés sont régénérés à l'exception de la glutamine, de l'arginine, de la sérine, de la thréonine et du tryptophane.

Le PTH arginine est hydrolysé en ornithine



SMITHIES ( 80 ) et LEVY ( 81 ) préfèrent l'hydrolyse acide. AFRICA et CARPENTER ( 82 ) ont réalisé une hydrolyse alcaline dans un milieu dépourvu d'oxygène. Ils ont obtenu de bons résultats avec un rendement élevé et quantitatif.

La régénération de la leucine et de l'isoleucine, permet sans ambiguïté leur identification (VAN ORDEN et CARPENTER)( 83 ).

#### 8) Autres méthodes d'identification des PTH-amino-acides.

Les PTH-amino-acides absorbent en infra-rouge, leurs spectres ont été étudiés par RAMACHANDRAN ( 84 ). Ils absorbent également en U.V. avec un maximum aux environs de 268 mμ et un minimum vers 245 mμ . Leur dispersion rotatoire a été étudiée par DJERASSI et coll. ( 85 ). Quelques méthodes radioactives ont été utilisées : LAURSEN a employé le <sup>3</sup>H phénylthiocyanate pour effectuer la dégradation. ( 86 ), CHERBULIEZ ( 87 ) et LAVER ( 88 ) se sont servi du <sup>35</sup>S P.I.T.C..

Ces procédés sont rapides et sensibles.

Les méthodes d'identification sont nombreuses, la spectrométrie de masse est sans doute la méthode la plus moderne, précise et sensible, mais elle représente encore une méthodologie complexe et coûteuse.

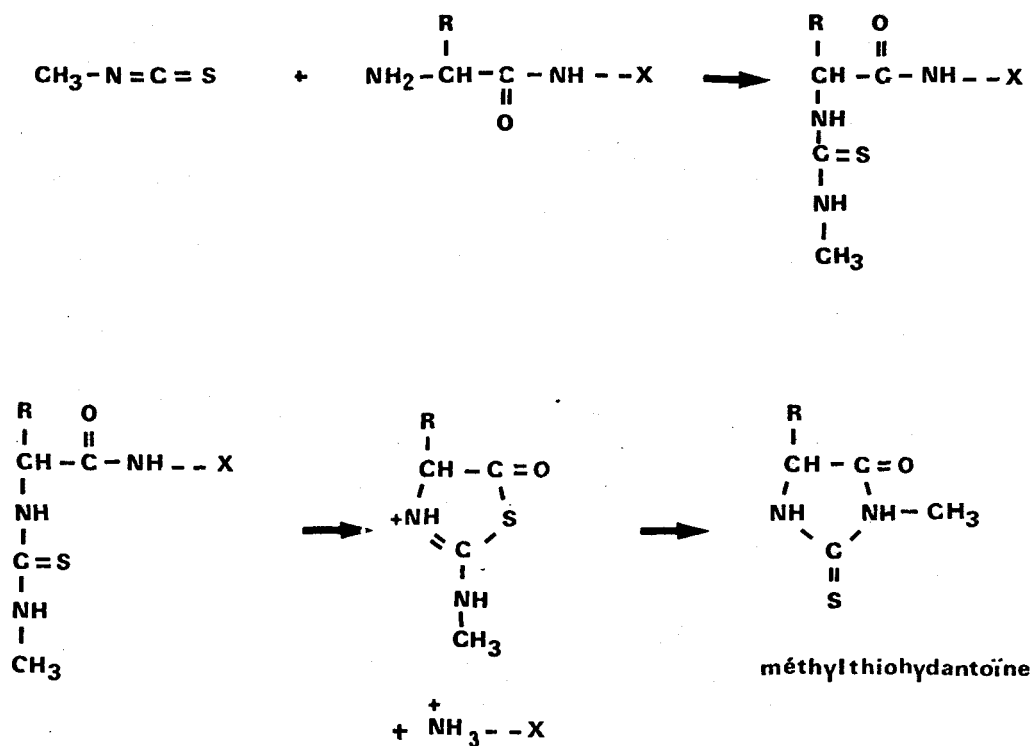
Actuellement, la chromatographie en phase gazeuse est la plus exploitée ; son utilisation est simple et elle permet à la fois l'étude qualitative et quantitative des réactions.

IV - VARIANTES DE LA METHODE D'EDMAN

Toutes les méthodes de dégradation décrites précédemment ont utilisé différents tampons de couplage, différents milieux de clivage ou de conversion, mais le réactif était toujours le phénylthiocyanate.

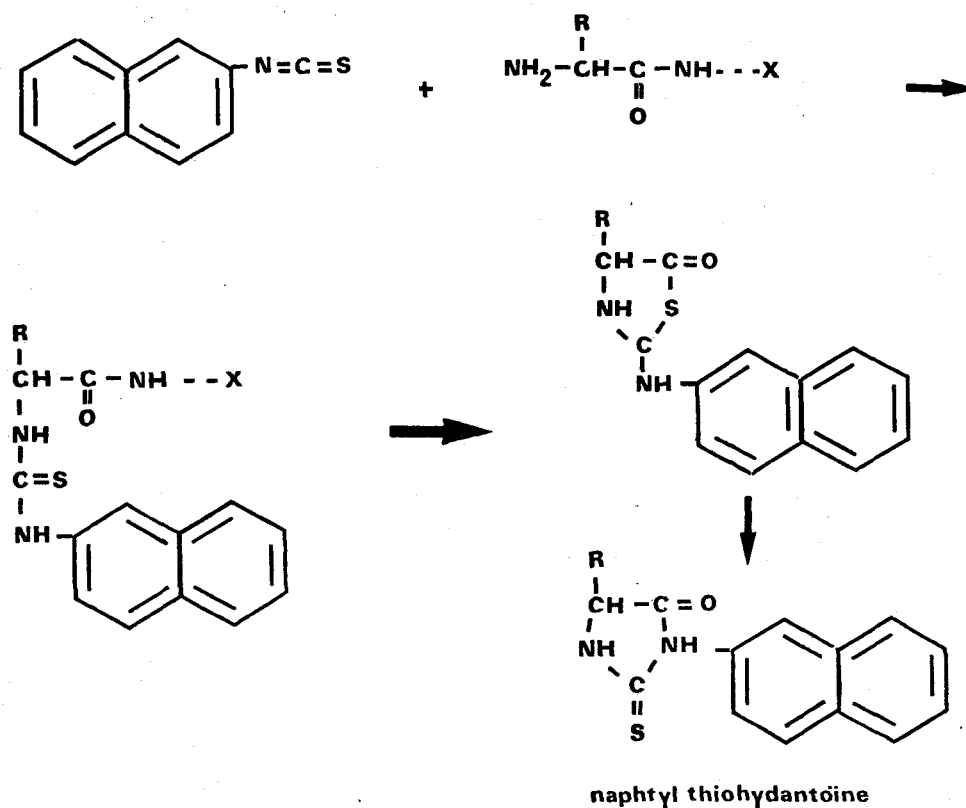
D'autres réactifs ont également été utilisés.

A - Le méthylthiocyanate (LAURSEN et RICHARDS)(89 )(90 )



La synthèse des méthylthiohydantoïnes amino-acides a été réalisée avec succès. Les méthylthiohydantoïnes amino-acides sont plus volatils que les phénylthiohydantoïnes, donc plus faciles à identifier en chromatographie en phase gazeuse.

B - Le naphtylisothiocyanate (KATSUKI et coll.)(91 )



Les naphthylthiohydantoïnes amino-acides ont une absorption plus importante en U.V. que les P.T.H. amino-acides, et sont plus facilement repérables.

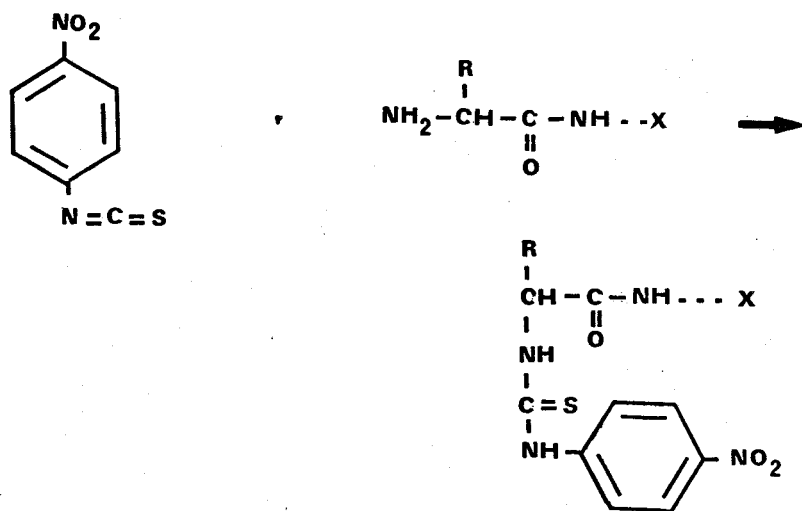
BRAUNITZER a fait réagir les composés sulfonés du naphthylisothiocyanate et du phénylisothiocyanate sur les petites chaînes peptidiques, dans le but d'éviter la solubilisation dans les solvants organiques ( 92 ). Nous décrirons cette stratégie dans le Chapitre II.

C - Les dérivés nitrés du phénylisothiocyanate (DROBNICA et KRISTIAN) ( 93)( 94 )

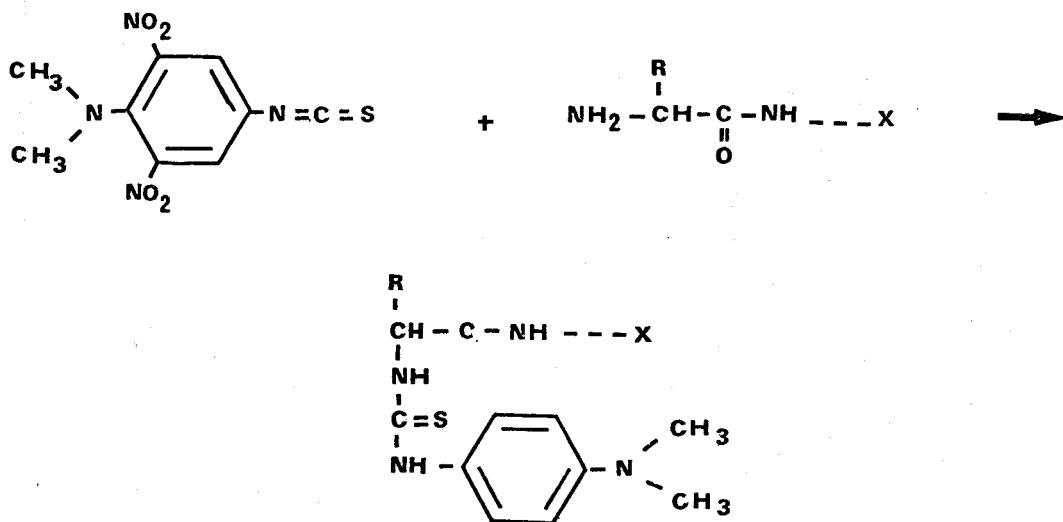
1) le p.nitrophénylisothiocyanate

Ce composé est plus actif que le phénylisothiocyanate en raison de la présence en para du groupement nitré : la réaction de

couplage sur la chaîne peptidique est plus rapide.



2) le 4-diméthylamino-3,5-dinitrophénylisothiocyanate  
(REITH, WALDRON) ( 95 )



Les thiohydantoïnes obtenues sont fortement colorées et faciles à localiser sur un chromatogramme.





## D - Le pentafluorophénylthiocyanate

Ce réactif a été utilisé par LEQUIN et NIALL ( 96 ) comme agent de couplage. Il est surtout utilisé avec succès pour dégrader les peptides : les pentafluorophénylthiohydantoïnes amino-acides sont moins polaires que les phényl ou les méthylthiohydantoïnes amino-acides, à l'exception de l'arginine et de l'histidine ; ils sont tous identifiés dans le système DC 560, en chromatographie en phase gazeuse. En lumière ultra-violette ils absorbent longtemps à basse longueur d'onde, ce qui permet une identification facile et quantitative. Leur volatilité est supérieure à celle des PTH amino-acides.

Il existe encore de nombreux réactifs utilisés comme agent de couplage. Nous pouvons mentionner l'emploi du p.azobenzène isothiocyanate (RAMACHANDRAN) ( 97 ).

## V - APPLICATION PERSONNELLE DE LA METHODE MANUELLE

### A - Techniques utilisées

#### 1) Différentes étapes de la dégradation

##### a) Réaction de couplage

Le tampon utilisé pour dissoudre le peptide est composé de diméthylallylamine, de propanol et d'eau (1,2/15/10) (V/V/V) Le pH est ajusté à 9,5 avec une solution à 10 p. 100 d'acide trifluoroacétique. Le pH de la solution est vérifié chaque jour, car nous avons remarqué qu'une diminution sensible du pH, entraîne une baisse appréciable de rendement des réactions.

5 à 10  $\mu$ l de P.I.T.C. (Pierce Chemical) sont ajoutés à 1  $\mu$ mole de peptide, dans un tube conique rodé, sous un léger courant d'azote, pendant 10 à 15 secondes. Le tube est placé au bain-marie (50°C) et agité toutes les 5 minutes. Après 40 minutes de réaction le tube est refroidi sous un courant d'eau froide : le P.I.T.C. en excès doit précipiter, ce qui traduit que ce réactif a été utilisé en excès ; sinon, on recommence l'opération pendant 20 minutes, après avoir ajouté 5  $\mu$ l de P.I.T.C. dans le tube.

### b) Extraction des thiourées et de l'excès de réactif

On extrait la solution 7 fois avec du benzène, jusqu'à ce que la phase aqueuse devienne limpide. On retire la phase organique avec précaution, pour ne pas aspirer et jeter le peptide qui se trouve à l'interphase. On sèche sous azote, le produit résiduel est lavé avec 200  $\mu$ l d'acétate d'éthyle, qui permet d'éliminer les traces de benzène (la quantité d'acétate d'éthyle utilisée doit être assez faible, pour ne pas entraîner des pertes importantes du peptide, qui est soluble dans ce solvant). On sèche à nouveau sous azote. Le tube est placé dans un dessiccateur thermostaté à 55°C sous un vide poussé pendant 30 minutes.

### c) Réaction de clivage

50  $\mu$ l d'acide trifluoroacétique, anhydre et traité (voir Chapitre technique) sont ajoutés. La réaction a lieu pendant 7 minutes à 50°C. L'acide est évaporé sous azote. On observe alors un film ou un dépôt rougeâtre sur les parois du tube.

La thiazolinone est extraite 3 fois, par 2 ml d'éther traité de façon à éliminer les peroxydes.

### d) Réaction de conversion

La conversion est effectuée en présence de 200  $\mu$ l d'HCl N à 80°C pendant 10 minutes (8 minutes, si l'acide aminé N-terminal attendu est la sérine ou la thréonine).

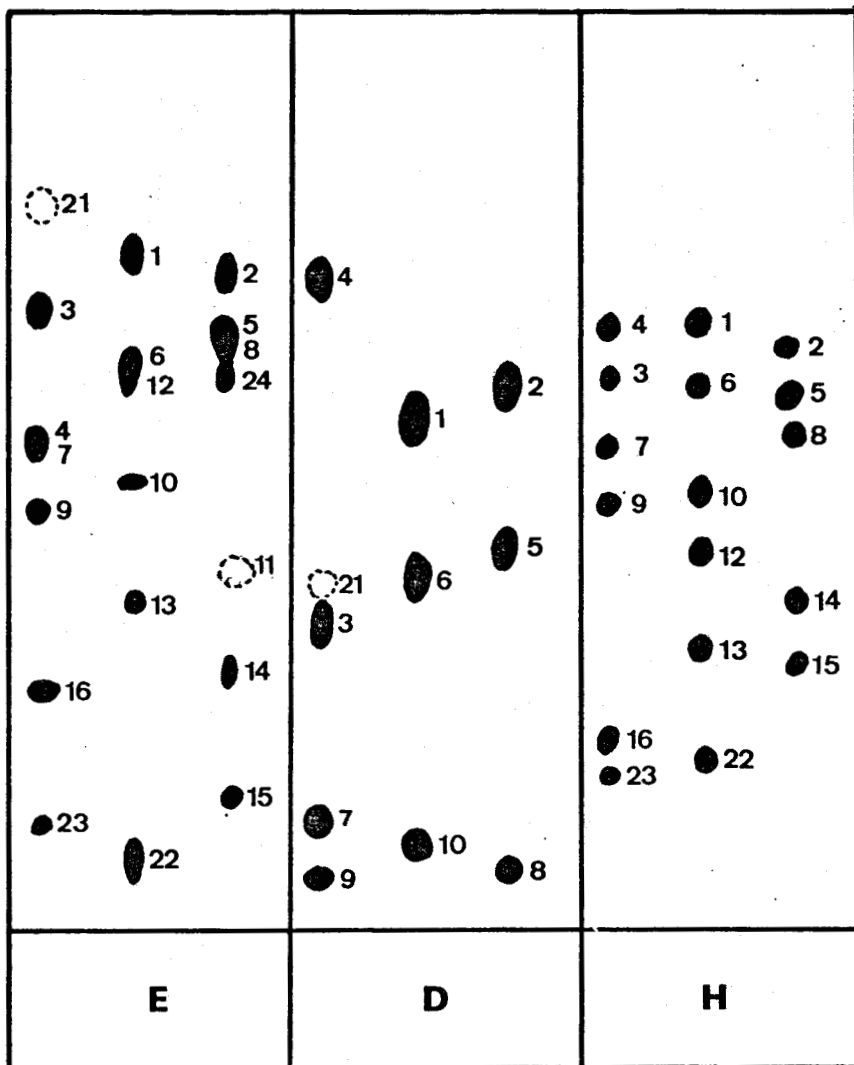
On réalise 3 extractions à l'acétate d'éthyle traité (voir Chapitre technique). La phase organique est séchée et le résidu repris par 20  $\mu$ l d'acétate d'éthyle.

## 2) Identification des P.T.H. amino-acides

Nous utilisons de préférence la chromatographie sur couches minces de silica gel, pour les études qualitatives : c'est une méthode simple, à laquelle nous sommes habitués. La chromatographie en phase gazeuse est réservée aux études quantitatives.

### a) Chromatographie sur couche mince de silica gel

Les plaques employées sont recouvertes de 0,25 mm de silica gel (MERCK C.C.M. 20 x 20 cm - F 254), en verre ou en plastique. Les cuves à chromatographie sont tapissées intérieurement de papier filtre Whatman n° 1 imprégné de solvant, elles ne sont employées que 24 heures après leur préparation.

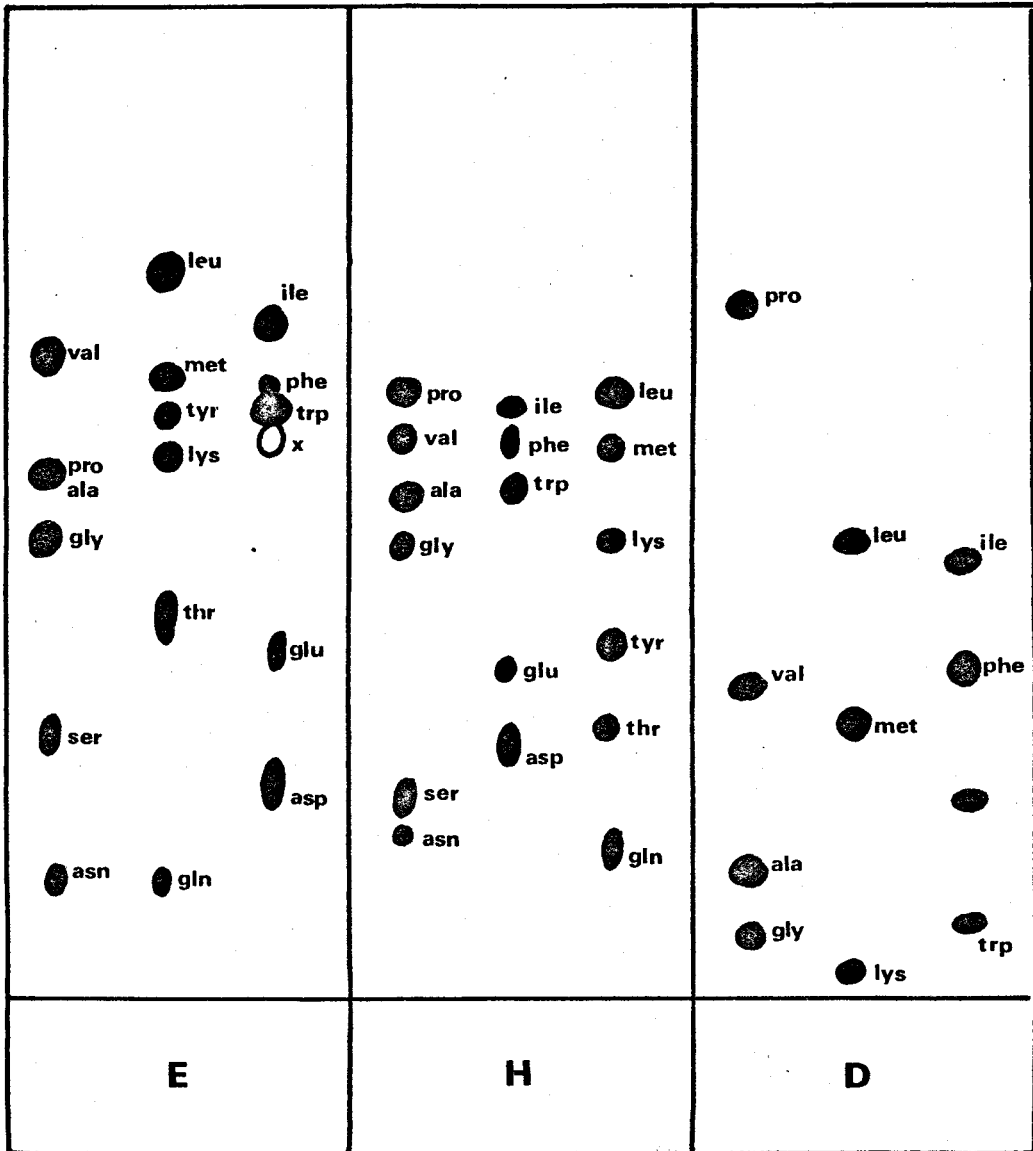


- |                 |                     |                                     |
|-----------------|---------------------|-------------------------------------|
| 1 leucine       | 9 glycine           | 17 arginine                         |
| 2 isoleucine    | 10 lysine           | 18 histidine                        |
| 3 valine        | 11 phenylthiourée   | 19 acide cysteique                  |
| 4 proline       | 12 tyrosine         | 20 hydroxyproline                   |
| 5 phenylalanine | 13 threonine        | 21 diphenylthiourée                 |
| 6 methionine    | 14 acide glutamique | 22 glutamine                        |
| 7 alanine       | 15 acide aspartique | 23 asparagine                       |
| 8 tryptophane   | 16 serine           | 24 impureté du PTH acide glutamique |

- ne migre pas



**Chromatographie des P.T.H. amino acides sur  
couche mince de silica gel (plaque de verre)**



x: impureté dans le PTH glu

Chromatographie des PTH amino-acides sur  
couche mince de silica gel (plaque de plastique)



La modification des systèmes de solvants proposés par EDMAN nous a permis d'obtenir une meilleure séparation des PTH-amino-acides.

\* Le système D

La plaque de silica gel est au préalable trempée horizontalement, pendant un temps très court (quelques secondes) dans un mélange formamide/acétone (3/7 (V/V) préparé extemporanément. Elle est séchée entre plusieurs feuilles de papier filtre, puis laissée à l'air ambiant pendant 30 minutes.

Les solutions de PTH amino-acides dans l'acétate d'éthyle (2 mg/ml) sont déposées en très petite quantité à la fois (1  $\lambda$ ) car la tache de dépôt a forte tendance à diffuser.

Le solvant est du xylène traité (Voir Chapitre technique)

\* Le système E

On réalise un mélange d'acétate de butyle (Carlo Erba) (PEB : 126°C) redistillé et d'eau (97 ml/3 ml) (Voir Chapitre Technique) qu'on laisse reposer une nuit après l'avoir agité pendant 1/2 heure dans une ampoule à décanter.

On récupère la phase acétate de butyle, et on y ajoute 3 ml d'acide propionique et 4 ml de formamide.

\* Le système H

Le solvant est composé d'un mélange de 120 ml de dichloroéthane (Fluka) et de 28 ml d'acide acétique (Fluka). La cuve qui contient le système H est placée dans une enceinte en polystyrène expansé de façon à obtenir à l'intérieur une température stable.

La durée de la migration dans chaque système est d'une heure environ. Les plaques de silica gel sont ensuite séchées à l'étuve à 110°C pendant 10 à 15 minutes et observées en lumière ultra-violette. Pour vérifier éventuellement une identification douteuse, la plaque est trempée dans une solution à 0,2 p. 100 de ninhydrine dans l'acétone, et séchée à l'étuve 5 à 10 minutes à 110°C, de façon à faire apparaître les colorations spécifiques de certains acides aminés. La plaque peut être trempée une deuxième fois dans une solution à 0,1 p. 100 de nitrate de cuivre dans l'éthanol, puis séchée 3 minutes

à 110°C.

Certains acides aminés ont une autre coloration ; les PTH glyco-colle, lysine, acide aspartique, méthionine deviennent rouges, les PTH valine et glutamine roses et les PTH phénylalanine, tyrosine et thréonine jaunes.

b) Identification des PTH arginine, histidine et acide cystéique

Pour séparer le PTH acide cystéique des PTH arginine et histidine, nous procédons à une électrophorèse sur papier Whatman n° 3 dans un tampon de pH 3,9 (tampon pyridine/acide acétique/eau - 30/100/4870). La révélation est réalisée par trempage dans une solution de ninhydrine à 1 p. 100 dans l'acétone, après marquage des taches d'un trait de crayon ; on décolore l'électrophorégramme par le mélange HCl/acétone (v/v) et on le sèche. On identifie les PTH histidine et arginine par les réactions spécifiques de PAULY (PTH-histidine) et de SAKAGUCHI (PTH-arginine).

c) La chromatographie en phase gazeuse

(appareil Fracto Vap, mod. G.I. Carlo Erba)

Le système suggéré par la Société JEOL ( 98 ) a été préféré au système D.X.O. ayant pour phase stationnaire le mélange de trois silicones DC 560, XE 60 et OV 22. PISANO-BRONZERT (99 ). Pour identifier les PTH asparagine, glutamine et histidine avec le système D.X.O. il fallait injecter 10 µg de PTH amino-acides.

Le nouveau système permet de les identifier en injectant 2 µg, et les quantités nécessaires pour obtenir une séparation des autres PTH amino-acides, sont en général plus faibles (inférieures à 1 µg).

Les PTH amino-acides sont injectés en solution dans l'acétate d'éthyle, sauf ceux de l'asparagine, de la glutamine et de l'histidine qui sont dissous dans la pyridine. La colonne (1,20 m x 2 mm) contient une solution à 10 p. 100 de silicone S.E. 30 sur chromosorb Q (80/100 mesh).

Le programme de température est le suivant :

- 180°C pendant 10 minutes
- augmentation de 3 degrés chaque minute jusque 270°C.

Les résultats obtenus sont reproduits sur les schémas n° 10

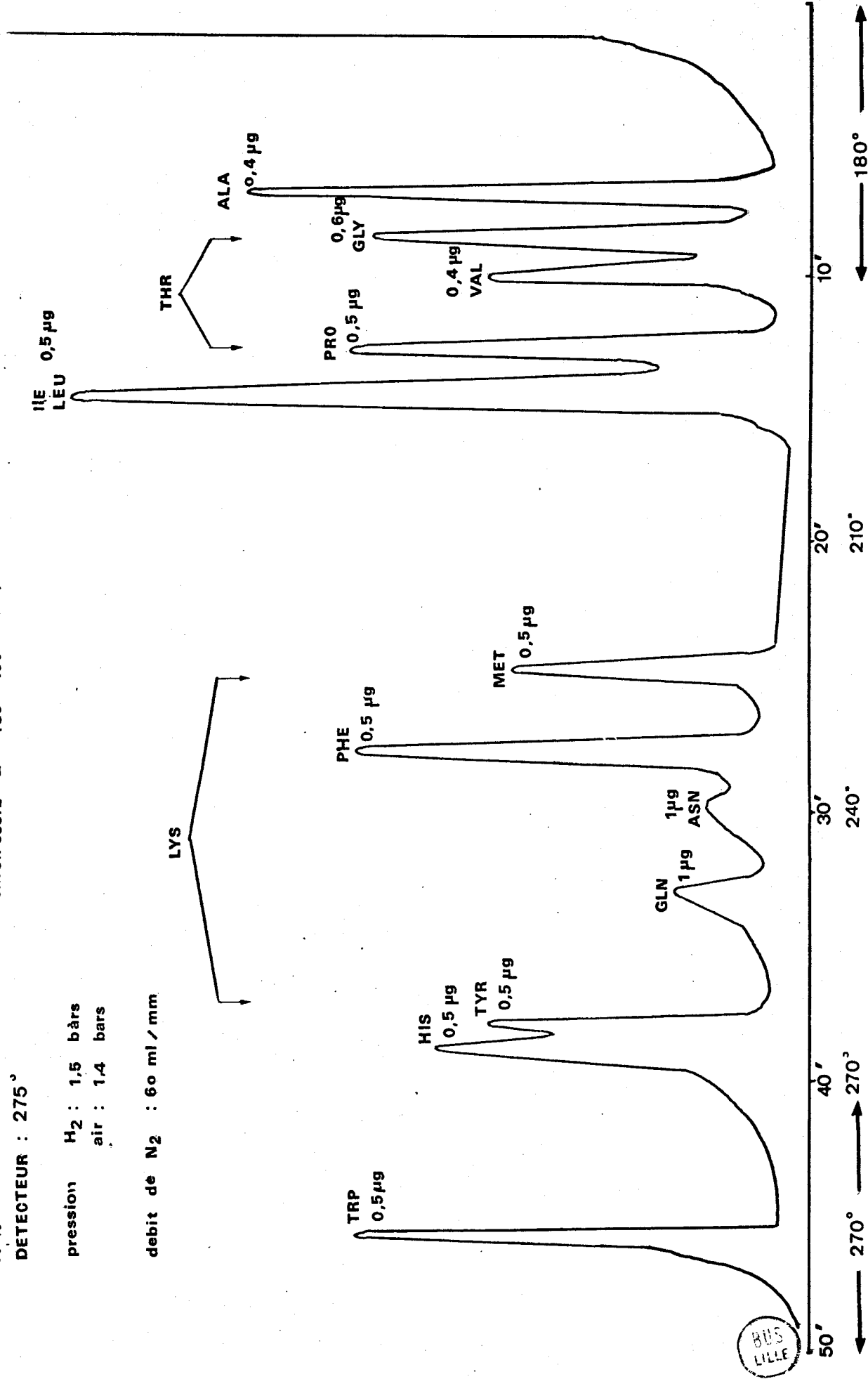
et 11.

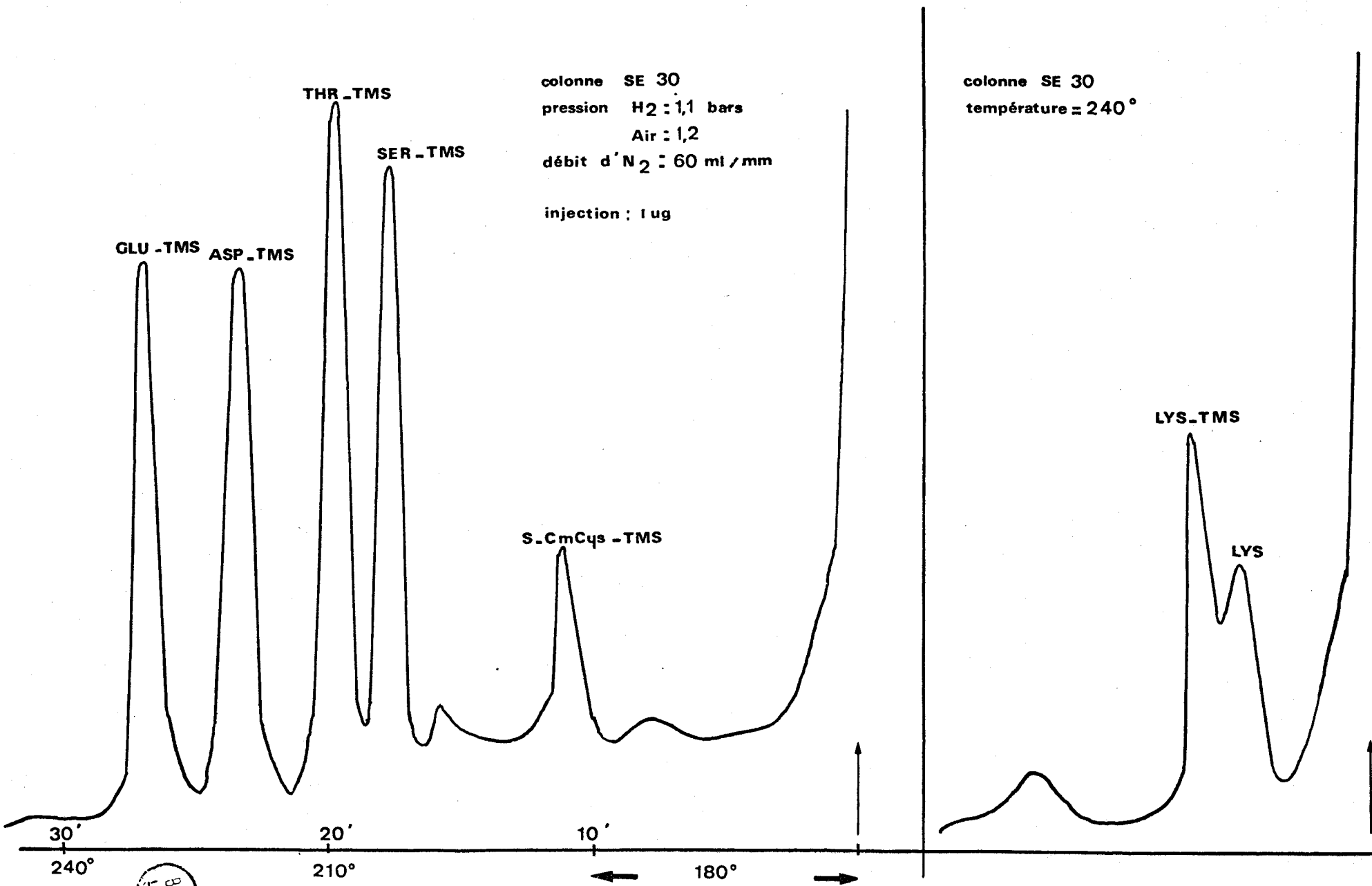
10 % DE SILICONE SE 30  
DETECTEUR : 275

chromosorb Q ( 80 - 100 mesh )

pression H<sub>2</sub> : 1,5 bars  
air : 1,4 bars

debit de N<sub>2</sub> : 60 ml/mm





colonne SE 30  
 pression H<sub>2</sub> : 1,1 bars  
 Air : 1,2  
 débit d'N<sub>2</sub> : 60 ml/mm  
 injection : 1 µg

colonne SE 30  
 température = 240°



CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES PTH amino-acides triméthylsilylés (TMS)



## B - Résultats

### 1) Détermination de la structure d'un peptide trypsique de la myoglobine de Blaireau

La séquence en acides aminés de la myoglobine de Blaireau a été établie par comparaison avec celle des myoglobines déjà étudiées (Boeuf, Cheval, etc...). La structure du peptide à vérifier est la suivante :

Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Glu-Val-Leu-Ile-Arg

La détermination de cette séquence a été réalisée par les méthodes classiques et par la méthode de dégradation récurrente d'Edman. Ce peptide trypsique a été choisi en fonction de sa longueur moyenne : un peptide trop petit risquait d'être soluble dans les solvants organiques utilisés pour les lavages et la séquence d'un peptide trop grand n'aurait pu être déterminée complètement. En plus, l'absence d'acides aminés aromatiques, dans la composition de cette chaîne peptidique permet d'éviter les coupures secondaires provoquées par les hydrolyses enzymatiques.

#### \* Méthodes classiques

La principale méthode employée est l'hydrolyse trypsique ; la trypsine est utilisée en raison de sa haute spécificité vis-à-vis des liaisons dans lesquelles sont impliqués les groupements carboxyliques de la lysine et de l'arginine : la coupure a lieu au niveau des liaisons Arg-X et Lys-X, sauf si X est la proline.

Les réactions d'hydrolyse et de dansylation, les actions successives de l'aminopeptidase M, du N-bromosuccinimide et des carboxylases A et B ont permis de reconstituer la séquence du peptide trypsique.

#### a) Hydrolyses acides et enzymatiques

La composition en acides aminés du peptide est déterminée après une hydrolyse acide (HCl 5,6 N) en tube scellé à 105°C pendant 24 heures.

Si le peptide contient des acides aminés dicarboxyliques (acide aspartique et glutamique) ou du tryptophane, nous devons réaliser une hydrolyse totale enzymatique de 24 heures pour distinguer les amides (glutamine et asparagine).



b) Dansylation - Couplage Dansyl-Edman (voir chapitre technique)

Les huit premiers acides aminés du peptide ont pu être déterminés par le procédé de couplage dansyl-Edman. Seuls, les résidus 2 et 4 ne peuvent être rigoureusement déterminés comme étant la glutamine et l'asparagine, ou leurs acides correspondants.

c) Action de l'aminopeptidase M

L'hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M libère 1 glutamine, deux acides glutamiques et un acide aspartique. Le résidu 4 est donc l'acide aspartique.

d) Action du N-bromosuccinimide (N.B.S.) et étude des peptides obtenus

Le N-bromosuccinimide coupe la chaîne peptidique au niveau du résidu histidine ; les deux peptides obtenus  $P_1$  et  $P_2$  sont étudiés (voir Figure n°1 ).

L'hydrolyse du peptide initial par l'aminopeptidase M libère 2 acides glutamiques, 1 glutamine et 1 acide aspartique. Après coupure au N.B.S., action de l'aminopeptidase M sur  $P_1$  et action des carboxylases sur  $P_2$ , les résidus 2 et 11 ont été identifiés comme étant de l'acide glutamique, et nous pouvons déduire que le résidu 10 est de la glutamine.

\* Dégradation d'EDMAN

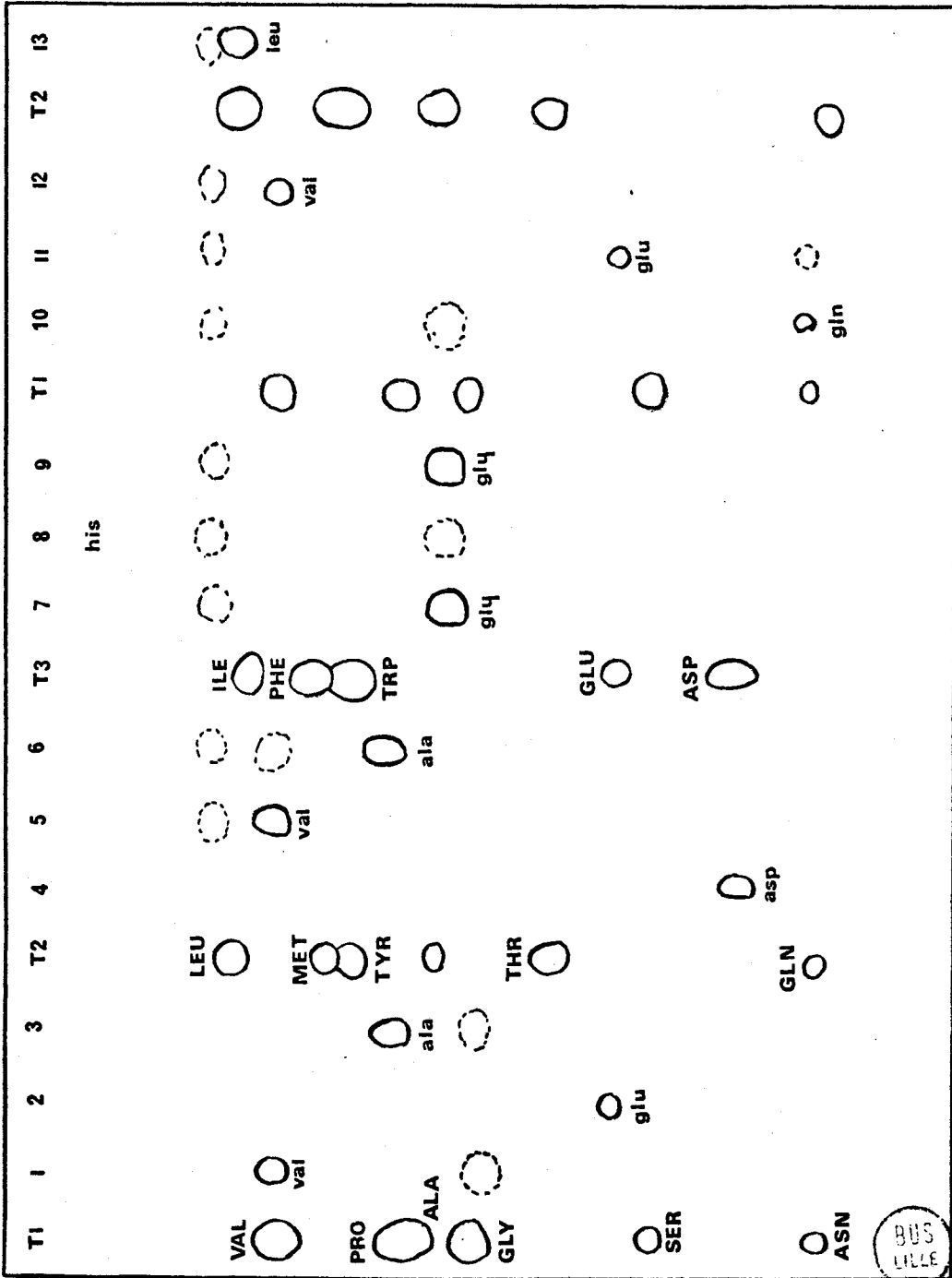
1  $\mu$ mole de peptide a été nécessaire pour établir la séquence du peptide tryptique en une semaine. La dégradation d'Edman a été réalisée sur les 13 premiers résidus d'acides aminés N-terminal. Le résidu d'arginine en position C-terminale a été identifiée par hydrazinolyse, et le résidu 14 par différence. (Schéma n° 12 ).

2) Détermination du peptide C-terminal de la myoglobine de Blaireau

Ce peptide de 22 résidus d'acides aminés a été obtenu après coupure au bromure de cyanogène de la myoglobine de Blaireau, au niveau du résidu méthionine.







### dégradation d'un peptide trypsique de la myoglobine de blaireau

chromatographie sur couche mince de silica gel des PTH amino - acides schéma 12

### \* Etude du peptide par les méthodes classiques

Après hydrolyse totale du peptide et détermination de sa composition en acides aminés, nous déterminons l'acide aminé N-terminal comme étant un résidu de lysine, puis nous procédons à une hydrolyse du peptide par la trypsine.

#### a) Hydrolyse trypsique

5 peptides tryptiques sont obtenus ( $P_1, P_2, P_3, P_4, P_5$ ). Ces peptides, sauf  $P_5$ , possèdent obligatoirement une lysine ou une arginine en C-terminal.

L'hydrolyse totale de chacun d'eux, suivie d'une analyse, permet de positionner deux peptides. L'un d'eux ne possède dans sa composition, ni d'arginine, ni de lysine : il s'agit donc de  $P_5$ . Un autre, constitué uniquement de lysine, est identifié comme étant  $P_1$ .

Le procédé d'hydrolyse par la trypsine n'est pas suffisant pour établir l'ordre d'enchaînement des peptides libérés par hydrolyse tryptique du peptide C-terminal de myoglobine de Blaireau. Nous procédons donc également à une hydrolyse du peptide initial par la chymotrypsine.

#### b) Hydrolyse chymotrypsique

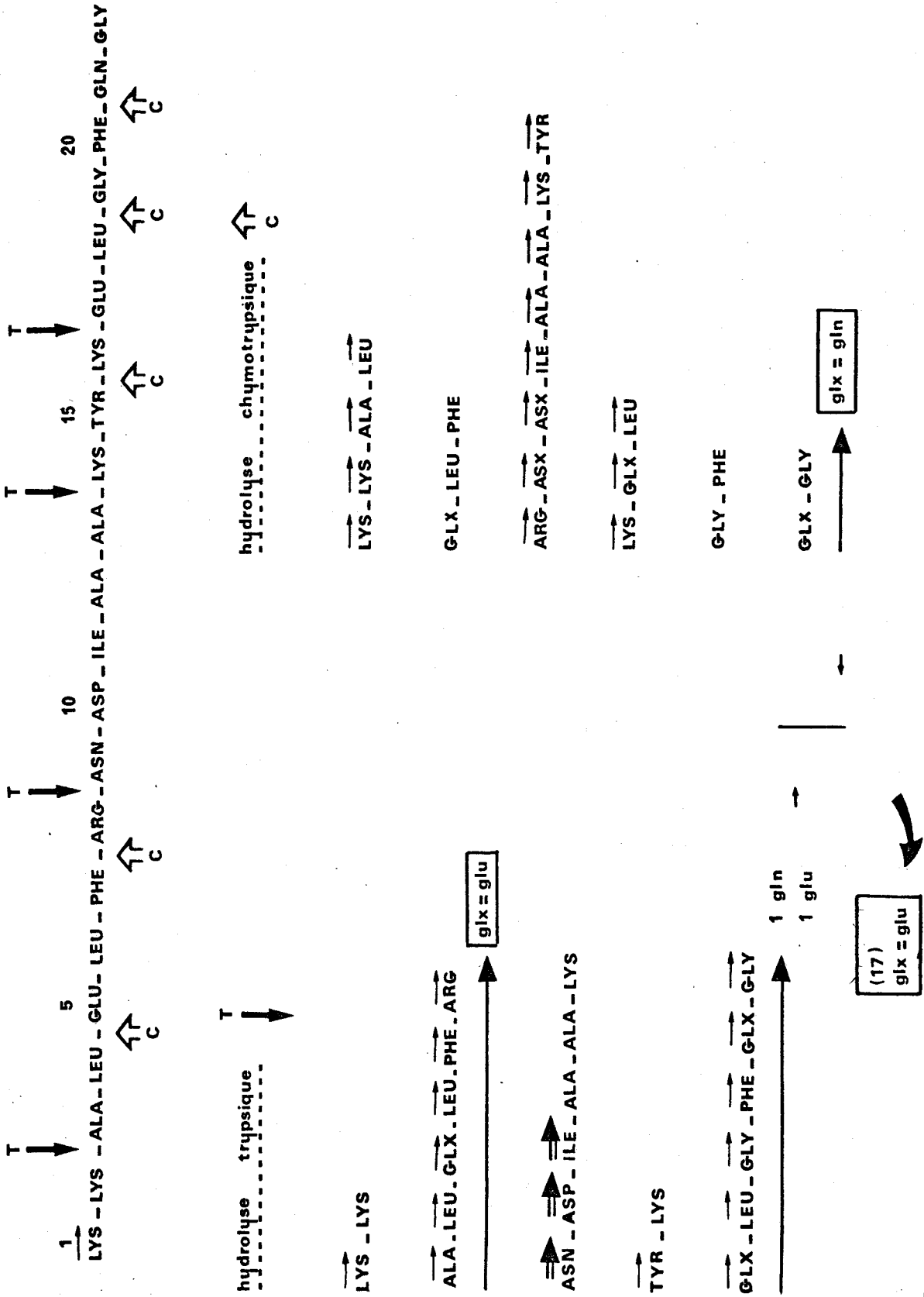
La spécificité d'action de la chymotrypsine est plus large que celle de la trypsine : la coupure des liaisons peptidiques a lieu au niveau des fonctions carboxyliques des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) et secondairement la coupure se fait au niveau de la leucine, de la méthionine et de l'histidine : 6 peptides sont obtenus  $P'_1, P'_2, P'_3, P'_4, P'_5, P'_6$  à partir de ce fragment ; leur étude permet de rétablir la séquence initiale (Figure n° II ).

200 mg de peptide C-terminal de la myoglobine de Blaireau ont été nécessaires pour effectuer ces hydrolyses.

L'étude de la séquence a été réalisée en 3 mois.

### \* Dégradation d'Edman

Cette analyse récurrente a demandé 1  $\mu$ mole de peptide et 11 jours de travail. Nous n'avons pu identifier que 20 résidus d'acides aminés ; plus un peptide est petit, plus il est soluble dans les solvants organiques, après 20 dégradations successives, le dipeptide résiduel, entraîné par un solvant a dû être éliminé.



PEPTIDE C - TERMINAL DE LA MYOGLOBINE DE BLAIREAU

FIGURE II



L'identification des PTH-amino-acides a été faite par chromatographie sur couche mince de silica gel (Schéma n° 13 )  
Le 22ème résidu a été déterminé après hydrazinolyse et le 21ème, identifié comme étant la glutamine, par différence.

### 3) Conclusion

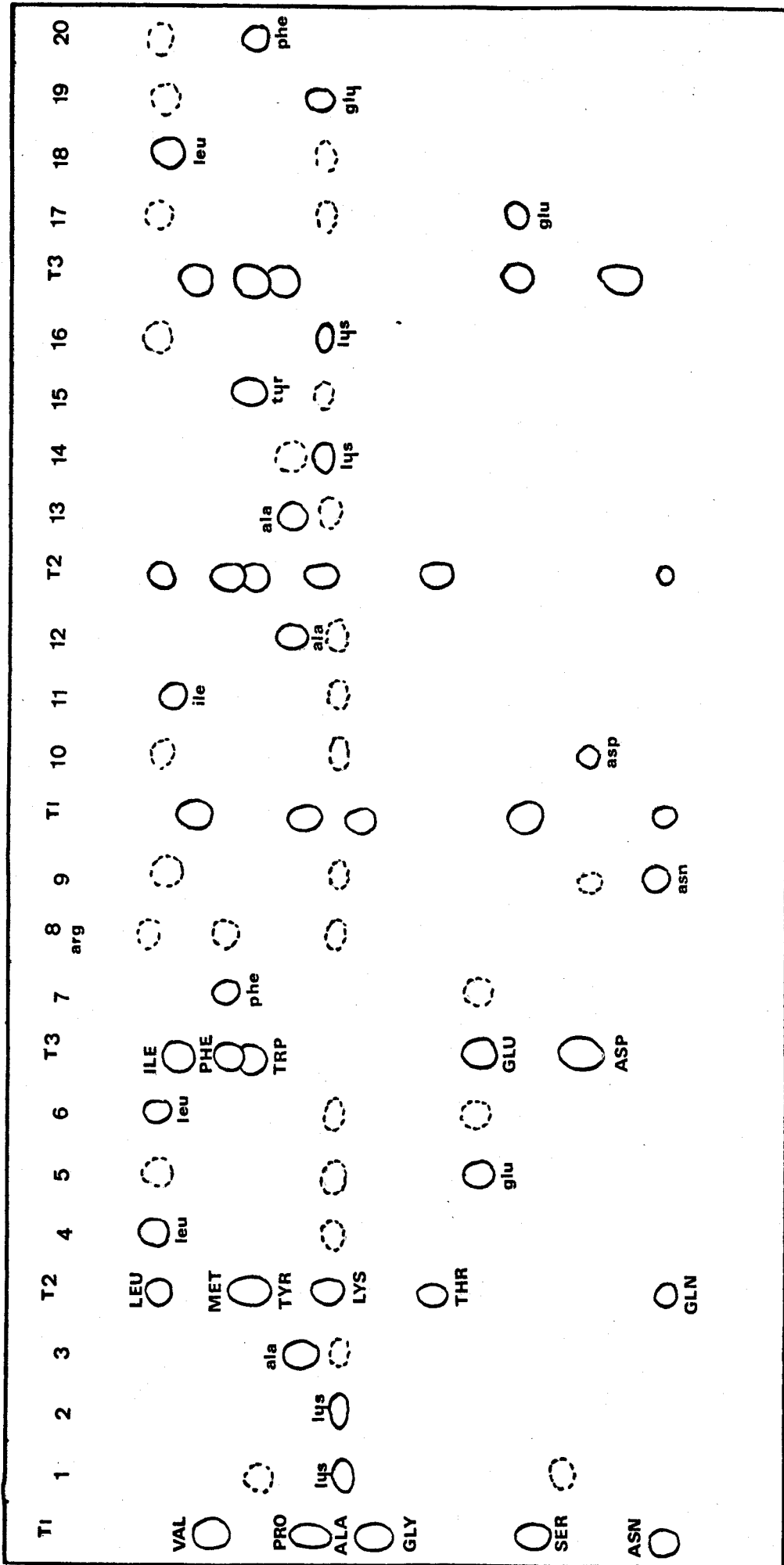
La méthode manuelle de dégradation d'Edman représente donc une stratégie efficace pour obtenir la séquence d'un peptide constitué d'une vingtaine d'acides aminés.

Comparée aux méthodes classiques d'étude de séquence, elle a l'avantage de différencier directement la glutamine, l'asparagine des acides correspondants. D'autre part, elle est plus rapide et exige moins de peptide initial (1  $\mu$ mole au lieu de 5 à 10  $\mu$ moles). L'identification des PTH amino-acides ne laisse en général pas d'ambiguïté. Cependant, la méthode de dégradation récurrente ne permet pas de déterminer complètement la structure d'un peptide constitué de plus de 25 amino-acides.

L'automatisation de la technique permet d'envisager directement l'étude de plus grandes séquences N-terminales : les résultats sont actuellement limités à une soixantaine de résidus ( 101 ).

Si le peptide est constitué de plus de 60 résidus d'acides aminés, la méthode classique redevient l'outil de travail.





BDS  
LILLE

dégradation du peptide c-terminal de la myoglobine de blaireau

Chromatographie sur couche mince de silica gel des PTH amino-acides

schéma 13

CHAPITRE II

---

LA DEGRADATION AUTOMATIQUE

(LE SÉQUENCEUR D'EDMAN)

La construction du Séquenceur a concrétisé la résolution parfaite des problèmes chimiques et des problèmes d'identification de la dégradation récurrente d'Edman. Son fonctionnement vise à remplacer la technique manuelle qui représente un travail astreignant pour le chercheur.

La méthode automatique d'Edman et Begg (102 ) assure une reproductibilité parfaite et rapide des opérations.

Le principe de cet appareil est d'étaler un film très mince de protéine ou de peptide sur les parois d'une coupe de centrifugation. Le film est obtenu en déposant près du fond de la coupe, qui tourne à grande vitesse, le peptide en solution : celui-ci est plaqué contre les parois par la force centrifuge. Les réactifs et les solvants peuvent monter le long de la paroi de la coupe, réagir avec le peptide ou la protéine, extraire les divers composés et être évacués par l'intermédiaire d'une vanne "3 voies", soit vers le collecteur de fractions, s'il s'agit d'un produit de réaction extrait par un solvant, soit vers la poubelle, s'il s'agit d'un solvant de lavage. Dans le cas d'un réactif, le niveau de liquide ne doit pas dépasser la limite supérieure du dépôt ; dans le cas d'un solvant, il atteint la gorge située à la partie supérieure de la coupe d'où il est évacué. Une description plus approfondie des différentes parties de l'appareil sera faite dans la suite du texte.

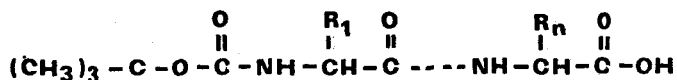
L'automatisation par EDMAN et BEGG de la technique de dégradation n'est pas la seule connue. LAURSEN a découvert et mis au point un autre procédé en phase solide (103 )( 104 )( 105 ) : l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique est liée par une liaison amide à un support solide constitué de résine polystyrène modifié avant de procéder aux réactions de dégradation. Le principe de la technique de LAURSEN est le suivant :

Une demi  $\mu$ mole de peptide est traitée avec de l'azide t-butyloxy-carbonyl et de la N-méthylmorpholine, dans la diméthylformamide, afin de bloquer le groupement  $\text{NH}_2$ . Les excès de réactifs et de solvants sont éliminés sous vide ; le peptide butyloxy-carbonylé est agité dans un mélange de diméthylformamide et de carbonyldiimidazole ; on ajoute environ 100 mg de résine polystyrène modifiée.

blochage du NH<sub>2</sub> terminal

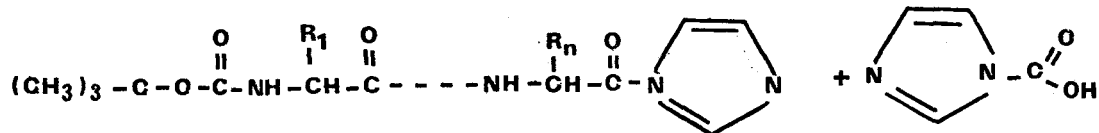


↓ diméthylformamide , N méthylmorpholine

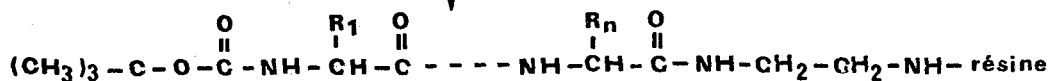


activation et couplage sur la résine

↓ carbonyldiimidazole dans la diméthylformamide

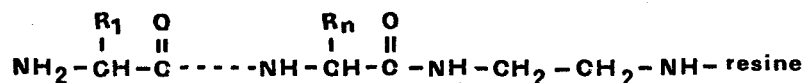


↓ resine -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>



déblochage du NH<sub>2</sub> terminal

↓ acide trifluoroacétique



La dégradation peut alors commencer sur le peptide fixé sur la résine ; les opérations de centrifugation, qui ont lieu dans le Séquenceur d'Edman sont remplacées par des opérations plus simples de filtration.

La fixation définitive du peptide avant les réactions, ainsi que les opérations de filtration ont pour avantage d'éviter aux petits peptides d'être entraînés facilement et d'être perdus dans les phases de lavage. Le succès de la méthode dépend essentiellement de la préparation de la résine et du peptide.

Un problème se pose pour les grands peptides qui possèdent des chaînes latérales avec des groupements carboxyliques : la réaction de fixation sur la résine n'est pas spécifique du groupement carboxylique terminal de la chaîne principale.

Comme pour la dégradation manuelle, les conditions expérimentales de la technique automatique ont une importance considérable. Si le rendement de la réaction de couplage, et de la réaction de clivage n'était que de 90 p. 100, la dégradation ne pourrait être poursuivie que 10 fois. Les performances de l'appareil sont donc directement liées au rendement de chaque réaction.

Nous allons étudier chaque facteur susceptible de nuire à ce rendement :

a) La pureté des réactifs et des solvants

Les aldéhydes aliphatiques forment des bases de Schiff (Chapitre I) avec les amines. La présence d'aldéhydes dans les réactifs ou dans les solvants bloque la réaction ou diminue considérablement le rendement.

Nous pouvons contrôler la présence d'aldéhyde par la réaction de Tollens (Chapitre technique).

Les ions métalliques gênent également la dégradation. Il n'a pas été possible de mettre en évidence la réaction qui intervenait dans ce cas.

b) La présence d'eau

L'eau peut être responsable des réactions secondaires, par exemple de l'hydrolyse du phénylisothiocyanate, qui aboutit à la formation de diphénylthiourée.

Ce composé gêne l'identification sur couche mince car il absorbe à la même longueur d'onde que les phénylthiohydantoïnes amino-acides.

La présence de traces d'eau dans l'acide heptafluorobutyrique peut être la cause d'une hydrolyse des liaisons peptidiques (106).

c) Autres réactions secondaires

Aucune réaction secondaire du phénylthiocyanate avec les groupements amines n'a été observée.

D'après KONIGSBERG (107), le groupe imidazole de l'histidine et le groupe phénol de la tyrosine se carbamylent pendant le couplage. Si ces réactions ont lieu, elles se font cependant avec un rendement trop faible pour que les dérivés apparaissent nettement parmi les produits de dégradation.

Des coupures de la chaîne polypeptidique peuvent se produire en milieu acide et donner lieu à la synthèse de plusieurs PTH-aminoacides.

L'oxygène provoque une désulfuration oxydative du groupe phénylthiocarbamyl et, la synthèse de la thiazolinone ne peut être réalisée. L'oxygène peut également oxyder les thiazolinones et rendre la conversion en phénylthiohydantoïnes impossible. Les réactions de couplage et de clivage doivent donc avoir lieu en milieu rigoureusement inerte : l'azote utilisé doit être de très haute pureté (99,997 p. 100) ; l'argon peut remplacer l'azote.

Une parfaite étanchéité de l'appareil est nécessaire. Même l'oxygène dissous dans le milieu peut favoriser la réaction de désulfuration, d'où la nécessité d'un barbotage préalable des flacons avec de l'azote et la conservation des solvants et des réactifs sous atmosphère inerte.

d) Nature des matériaux utilisés

Etant donné la nature très corrosive des réactifs utilisés (notamment l'acide heptafluorobutyrique), les canalisations, les conduits intérieurs des vannes, la coupe de réaction elle-même, doivent être faits d'un matériau très résistant et inattaquable : le pyrex, le teflon, l'or ont été utilisés pour réaliser ces différentes pièces.

## LE SEQUENCEUR SOCOSI

### A - DESCRIPTION

Les Sociétés SOCOSI, BECKMAN et JEOL ont construit des Séquenceurs. Nous avons personnellement utilisé celui de la Société SOCOSI (PS 100).

Cet appareil est constitué de 2 parties :

- la première est l'appareil proprement dit, où ont lieu les différentes réactions ;
- la deuxième est le bloc électronique, qui permet la programmation des opérations et commande les différents relais.

#### I - Première partie : l'ensemble chimique

L'appareil est constitué de sous-ensembles autonomes.

##### 1) Ensemble centrifugeuse, coupe de réaction

Une centrifugeuse entraîne la coupe de réaction, qui est placée dans une enceinte chauffée, dans laquelle, on peut, par l'intermédiaire de trois vannes groupées (vannes chaudes), réaliser des vides restreints ou poussés ou au contraire, introduire de l'azote sous pression.

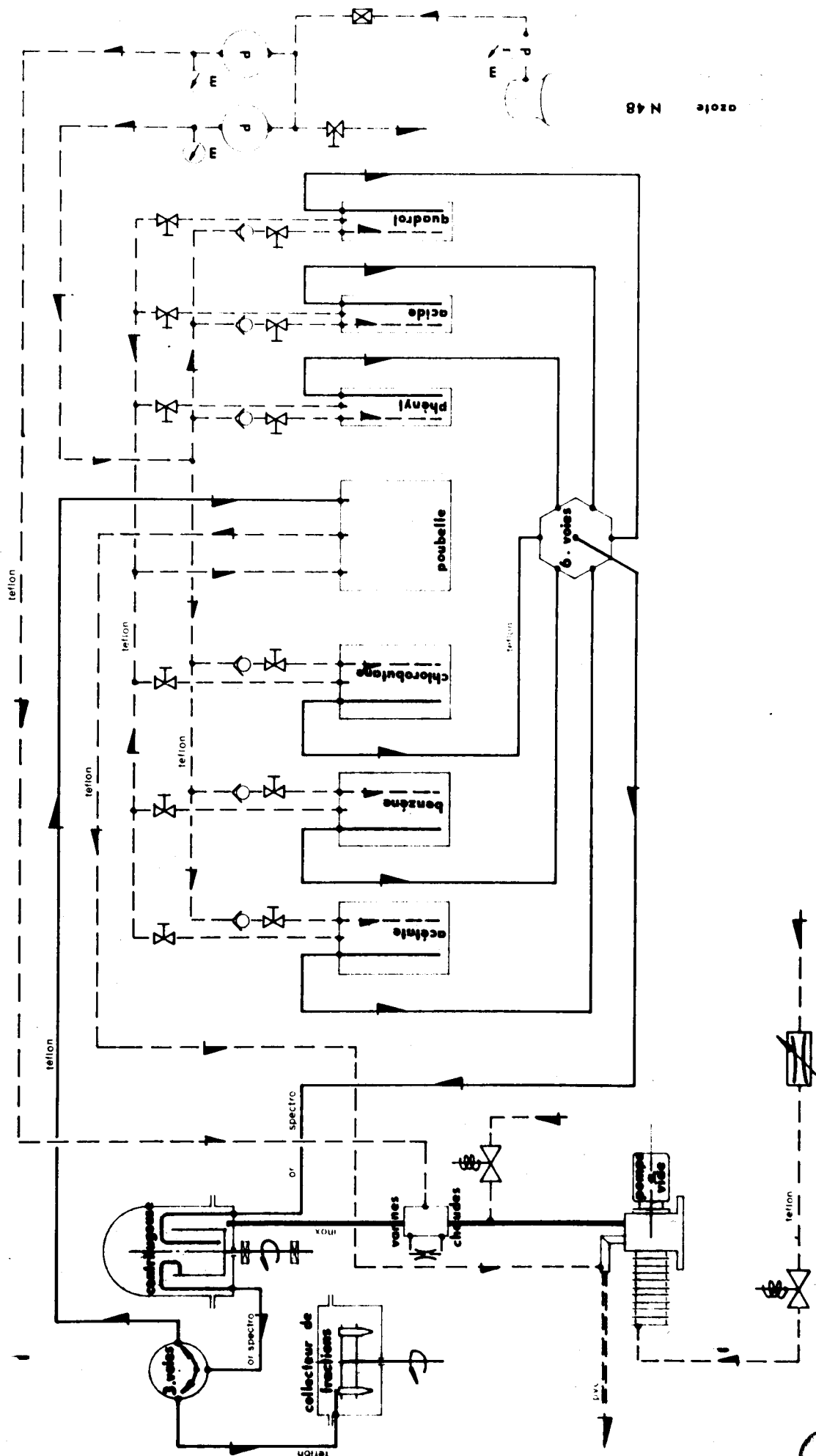
Le vide est assuré par une pompe à double étage, qui peut réaliser des prévides ou des vides restreints. L'azote est envoyé sous pression, grâce à un détendeur réglable et une vanne de commande. L'ensemble est maintenu à température constante.

##### a) La coupe de réaction

Elle est en verre borosilicaté, qui résiste aux réactifs et aux solvants.

Le fond de la coupe est conique ; une gorge creuse occupe la partie supérieure interne de la coupe, ce qui permet de collecter les liquides.

Les parties internes sont polies optiquement car le moindre défaut de la surface serait responsable d'une irrégularité du film



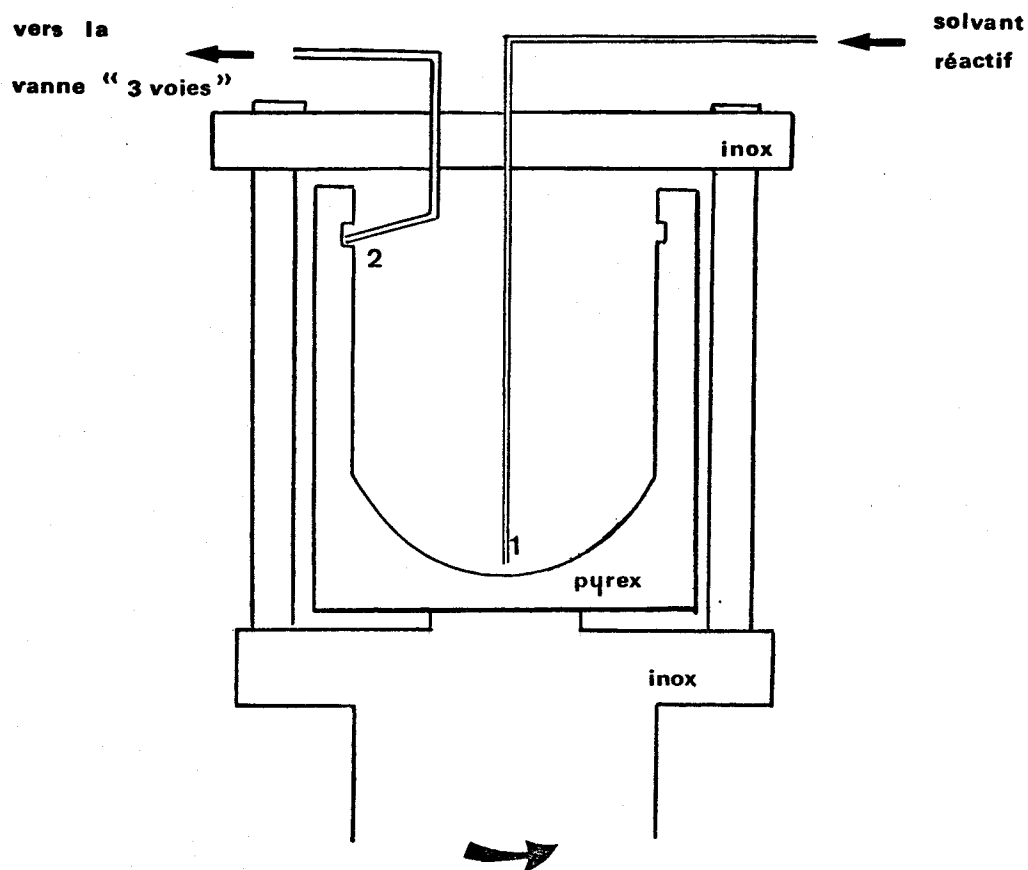
ozole N 48

**SCHEMA DES FLUIDES**



— SOCO S—





1, 2 : tubes en or

schéma de la coupe du séquenceur PS 100

SCHEMA 14



de peptide ou de protéine (Schéma 14 ).

#### b) La cloche

Elle est faite en pyrex, ce qui permet de surveiller les opérations de dégradation. Elle résiste aux chocs thermiques ; la base de la cloche est constituée par une collerette qui repose sur un joint encastré dans le support de la centrifugeuse et qui assure une parfaite étanchéité de l'ensemble. Cette cloche est maintenue par trois brides. Elle a été conçue pour donner un volume mort minimum à l'enceinte, volume que l'on a essayé de réduire récemment, en fixant un bouchon sur la coupe. Ce dispositif est très utile, quand on utilise un tampon très volatil, car il crée un point légèrement plus froid que la coupe de réaction et permet un recyclage des vapeurs éventuellement condensées.

#### c) Le système d'entraînement : la broche

La partie axe ou broche d'entraînement et la partie moteur sont indépendantes. L'entraînement est obtenu par des aimants quadripôles protégés de la corrosion par un revêtement d'or fin.

La vitesse de rotation atteint 1500 tours par minute.

La broche est en acier inoxydable et tourne sur deux roulements de grande précision en acier inoxydable.

#### d) Chauffage et régulation de la température

Le chauffage de l'ensemble est réalisé par deux sources de chaleur :

- la première assure le chauffage de la cloche ;
- la seconde assure le chauffage de la centrifugeuse :  
coupe de réaction et axe de la centrifugeuse.

La température de la cloche doit être légèrement supérieure à celle de la coupe, afin d'éviter des condensations gênantes. Le chauffage est assuré par un dépôt métallique transparent et conducteur entre deux électrodes, situées l'une au sommet de la cloche, l'autre sous la collerette à la base de la cloche.

La commande du chauffage est faite par un régulateur électronique à l'avant de l'appareil.

Le corps de la centrifugeuse représente une masse plus importante à chauffer. Un collier chauffant, placé sous le plateau support, entoure le corps de la centrifugeuse. La commande de ce

de ce système est obtenue par l'intermédiaire d'un relai à contact mercure/mercure.

La régulation du chauffage est assurée par une sonde, placée dans le corps et reliée à un régulateur situé à l'avant du Séquenceur.

#### e) Les lignes de collection et d'alimentation

Les lignes de collection sont réalisées en or de qualité spectrométrique, car l'or ordinaire contient des traces de cuivre, qui risquent d'être entraînées par l'acide et de bloquer les réactions. L'or a l'avantage sur le téflon de ne pas se dilater, et de ne pas être perméable à l'oxygène, même en faible épaisseur.

Les tubes en or sont fixés sur un pontet démontable situé au-dessus de la coupe de réaction, l'adaptation de petites colonnes latérales diminue les risques de déformation, lors de la manipulation.

Le point d'arrivée de la ligne d'alimentation dans la coupe de réaction est légèrement excentré pour diminuer la vitesse radiale des liquides apportés.

Les conduits d'alimentation arrivant à la vanne "6 voies" sont en téflon.

L'entrée d'azote et la sortie vide se font par le même conduit relié aux vannes chaudes. L'étanchéité de ce conduit est réalisée par un bicone en téflon et une vis en acier inoxydable.

#### 2) Les vannes chaudes

Elles se présentent sous forme d'un bloc en acier inoxydable, encadré par deux plaquettes chauffantes qui assurent à l'ensemble une température constante de 55°C. Cette température est maintenue dans le but de réchauffer l'azote, stockée à 20°C, avant de l'amener à l'intérieur de la cloche pour éviter un éventuel choc thermique.

##### a) La vanne de grand vide

Elle actionne un clapet qui, soulevé, met en communication la pompe à vide et la cloche de la centrifugeuse.

##### b) La vanne de prévide

Le clapet de la vanne de grand vide est fermé, la vanne de prévide ouvre un circuit plus étroit que le précédent, qui permet d'établir des vides restreints à l'intérieur de la cloche.

### c) La vanne d'entrée d'azote

Le conduit d'arrivée d'azote est muni d'un étranglement "doseur" ; si le gaz était amené par un conduit normal, il pourrait surtout après un vide, "souffler" le peptide ou la protéine séchée sur les parois de la coupe.

Les circuits de vide, de prévide et d'azote sont indépendants.

#### 3) La vanne à "six voies"

Les six conduits provenant des différents flacons contenant les réactifs et les solvants se rejoignent au niveau d'un noyau central.

Ces différents conduits peuvent être mis en communication avec le tuyau en or, qui amène les produits dans la coupe de réaction, au niveau de la vanne "six voies". Six électro-aimants commandent les pointeaux de fermeture.

#### 4) La vanne "trois voies"

Le corps de cette vanne est en pyrex poli, il est protégé par une virole en acier inoxydable. Elle est actionnée par un moteur à double sens de marche, permettant l'écoulement de la solution de thiazolinone dans le chlorobutane, vers le collecteur, ou l'écoulement des autres solvants (acétate d'éthyle, benzène) vers la poubelle.

Des systèmes de sécurité assurent :

- d'une part, l'impossibilité d'envoyer des produits, provenant de la vanne "6 voies" dans la coupe de réaction si la vanne "3 voies" est fermée.

- d'autre part, l'impossibilité d'ouvrir les vannes de vide quand la vanne "trois voies" est ouverte.

#### 5) Les réservoirs de stockage des solvants ou des réactifs

Les six flacons réservoirs se trouvent sous un capot de plexiglass. Ils contiennent :

- le phénylthiocyanate (P.I.T.C.) en solution à 5 p. 100 dans l'heptane ;

- le quadrol (IM) ou N,N,N',N',tétra (2-hydroxy-propyl)-éthylène diamine, qui est le tampon de couplage.

Ce tampon a pour rôle de maintenir un pH de 9 dans le milieu, de capter les ions  $H^+$  libérés lors de la réaction de couplage et

de solubiliser la protéine.

- l'acide heptafluorobutyrique ;
- l'acétate d'éthyle qui contient 0,1 p. 100 d'acide acétique ;
- le 1, chlorobutane, dans lequel nous avons ajouté un réducteur : le 1,4 butanedithiol (HERMODSON)(108).
- le benzène.

#### 6) Le collecteur de fractions

Il est placé dans une enceinte réfrigérée où la température est réglée par un thermostat (entre + 8°C et + 10°C). Il peut contenir 30 tubes, il est en acier inoxydable, et facilement démontable. La rotation du collecteur, à la fin de chaque dégradation est assurée automatiquement par un moteur.

Une récente amélioration technique a été réalisée, par la Société SOCOSI, pour évaporer le chlorobutane contenu dans les tubes. Elle consiste à faire arriver l'azote, de façon continue à l'intérieur du volume refroidi ; le couvercle de l'enceinte est percé de façon à permettre l'évacuation des vapeurs et du gaz. Ce système ne permet pas l'évaporation complète du contenu des tubes.

Un dispositif plus élaboré, n'entraînant pas de modifications coûteuses sur les appareils déjà installés est à l'étude.

## II - Le bloc électronique

Cette partie permet de commander, par l'intermédiaire d'un programme affichable par fiches à diodes, sur une matrice les opérations.

La durée de chaque opération (ou étape) peut aller de 1 à 9999 secondes. Le nombre d'étapes peut être de 45 pour un cycle de dégradation.

Le déroulement de chaque dégradation se fait automatiquement à partir d'une étape sélectionnée et affichée sur le cadran "présélection cycles".

Quand un cycle de dégradation est terminé, un deuxième recommence automatiquement à partir de l'étape présélectionnée. Ce type de programmeur permet à tout moment d'effectuer une modification, soit sur le cycle en cours, soit sur celui qui suivra. Nous pouvons intervenir :

- pour répéter l'étape en cours ; il est assez fréquent

MINUTERIE

SECONDES

RELAIS

| SECONDES |      |     |    | RELAIS |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----------|------|-----|----|--------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| x1000    | x100 | x10 | x1 |        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 8        | 4    | 2   | 1  | 1      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 2      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 3      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 4      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 5      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 6      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 7      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 8      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 9      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 10     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 11     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 12     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 13     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 14     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 15     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 16     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 17     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 18     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 19     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 20     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 21     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 22     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 23     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 24     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 25     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 26     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 27     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 28     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 29     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 30     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 31     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 32     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 33     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 34     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 35     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 36     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 37     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 38     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 39     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 40     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 41     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 42     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 43     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 44     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|          |      |     |    | 45     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

BUS  
LILLE

de réaliser un double couplage, ou un double clivage.

- pour passer de l'étape en cours à l'étape suivante ;
- pour supprimer ou ajouter des commandes par affichage de fiches à diodes, au cours du cycle en cours.

Des programmes standards existent pour déterminer la séquence des peptides et des protéines ; cependant, pour améliorer les résultats, nous pouvons modifier ces programmes d'après les premiers résultats obtenus.

### 1) La matrice double à fiches à diodes

La première partie de la matrice sert à programmer la durée de chaque opération.

Quand le séquenceur est en fonctionnement, des voyants visualisent l'étape et les relais correspondant aux fonctions en cours.

Les différentes fonctions commandées sont :

- 1) Ouverture de la vanne d'entrée d'azote dans la centrifugeuse
- 2) Ouverture de la vanne de prévide dans la centrifugeuse
- 3) Ouverture de la vanne de grand vide dans la centrifugeuse
- 4) Ouverture de la vanne "3 voies" vers la poubelle
- 5) Ouverture de la vanne "3 voies" vers le collecteur de fractions.
- 6) Fermeture de la vanne "3 voies"
- 7) Ouverture de la vanne "6 voies" vers le P.I.T.C.
- 8) Ouverture de la vanne "6 voies" vers l'acétate d'éthyle
- 9) Ouverture de la vanne "6 voies" vers le chlorobutane
- 10) Ouverture de la vanne "6 voies" vers le quadrol
- 11) Ouverture de la vanne "6 voies" vers l'acide
- 12) Ouverture de la vanne "6 voies" vers le benzène
- 13) Ouverture de la vanne de lest de la pompe
- 14) Rotation du collecteur de fractions

### 2) Les différentes commandes manuelles

- Le bouton poussoir : "début séquence" et le voyant lumineux correspondant ;

- Le bouton poussoir "arrêt séquence" ;

Il permet un arrêt immédiat du travail, mais conserve en mémoire l'étape et la durée de celle-ci.

- Le bouton poussoir avance "pas à pas"

| étapes |                               | temps     | relais commandés |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            |            |      |         |                |   |   |
|--------|-------------------------------|-----------|------------------|------|-------------------------------|-------|---------|--------------|--------------|------|-----------------|------------|------------|------|---------|----------------|---|---|
| N°     | FONCTIONS                     | SECONDES  | av. collecteur   | lest | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> | acide | quadrol | chlorobutane | ac. d'éthyle | PITC | "3voies" fermée | collecteur | evacuation | vide | by pass | N <sub>2</sub> |   |   |
|        |                               |           | 16               | 15   | 14                            | 13    | 12      | 11           | 10           | 9    | 8               | 7          | 6          | 5    | 4       | 3              | 2 | 1 |
| 1      | PITC                          | 4         |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 | ●          |            |      | ●       |                |   | ● |
| 2      | quadrol                       | 4 0       |                  |      |                               |       |         |              | ●            |      |                 |            |            |      | ●       |                |   | ● |
| 3      | réaction 1                    | 1 5 0 0   |                  |      |                               | ●     |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 4      | réaction 1'                   | 3 0 0     |                  |      |                               | ●     |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 5      | prévide                       | 2 0 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 6      | vide                          | 4 5 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                | ● | ● |
| 7      | rentrée d' N <sub>2</sub>     | 1 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 8      | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> | 2 1 0     |                  |      |                               | ●     |         | ●            |              |      |                 |            |            |      | ●       |                |   | ● |
| 9      | ac. d'éthyle                  | 250 à 100 |                  |      |                               | ●     |         |              |              | ●    |                 |            |            |      | ●       |                |   | ● |
| 10     | retard                        | 6 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 11     | prévide                       | 2 0 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 12     | vide                          | 1 0 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 13     | purge                         | 4         |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 14     | vide                          | 2 0 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                | ● | ● |
| 15     | rentrée d' N <sub>2</sub>     | 1 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 16     | ac. heptafluorobutyrique      | 1 6       |                  |      |                               | ●     |         | ●            |              |      |                 |            |            |      | ●       |                |   | ● |
| 17     | réaction 2                    | 1 8 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 18     | prévide                       | 6 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 19     | rentrée d' N <sub>2</sub>     | 4         |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 20     | chlorobutane                  | 4         |                  |      |                               | ●     |         |              |              | ●    |                 |            |            | ●    |         |                |   | ● |
| 21     | retard                        | 2 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            |            | ●    |         |                |   | ● |
| 22     | prévide                       | 7 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 23     | vide                          | 9 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 24     | rentrée d' N <sub>2</sub>     | 4         |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 25     | chlorobutane                  | 6 5       |                  |      |                               | ●     |         |              |              | ●    |                 |            |            | ●    |         |                |   | ● |
| 26     | retard                        | 6 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            |            | ●    |         |                |   | ● |
| 27     | prévide                       | 2 0 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 28     | vide                          | 1 0 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 29     | purge - av. collecteur        | 4         | ●                |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 30     | vide                          | 2 0 0     |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |
| 31     | rentrée d' N <sub>2</sub>     | 1 0       |                  |      |                               |       |         |              |              |      |                 |            | ●          |      |         |                |   | ● |







Il permet de passer à l'étape suivante, pour raccourcir par exemple une étape de vide quand celui-ci est jugé suffisant, ou une étape de lavage par un solvant.

- Le bouton "présélection cycle"

Il permet de choisir l'étape de départ, ce qui est fait en fonction de l'état de la protéine.

- Le bouton "remise au zéro"

- La mémoire cycle qui indique le nombre de cycles déjà effectués.

Un compteur mémorise le nombre d'étapes effectuées.

- L'indicateur de la durée restant pour l'étape en cours.

- Les interrupteurs secteur et relais, et les voyants correspondants.

### 3) Les systèmes de sécurité

L'électronique de programmation est munie de plusieurs systèmes de sécurité ; il est impossible :

- d'ouvrir les vannes de vide si la vanne d'azote n'est pas fermée ;

- d'ouvrir la vanne "3 voies", ou la vanne "6 voies" si la vanne d'azote est fermée.

## B - MANIPULATION DU SEQUENCEUR

### I - Dissolution et dépôt de la protéine ou du peptide

300 nanomoles de protéine ou de peptide sont dissoutes dans 300 microlitres d'eau bidistillée, où nous ajoutons éventuellement une goutte d'acide acétique glacial.

La dissolution peut également se faire dans 300 microlitres d'acide trifluoroacétique anhydre, notamment dans le cas des peptides provenant de coupure au bromure de cyanogène. La solution doit être limpide, une centrifugation est parfois nécessaire pour éliminer l'insoluble.

La centrifugeuse du Séquenceur est mise en marche (1500 tours par minute). Le dépôt de la solution peptidique est réalisé très lentement avec une seringue à insuline, munie d'un capillaire en téflon, le plus près possible du fond de la coupe, sans toutefois le toucher, de façon à obtenir un film mince et homogène.

La cloche est remise en place, un retard de 50 à 60 secondes est prévu : la mise sous vide immédiate de la coupe de réaction entraînerait une ouverture trop rapide des vannes, et une aspiration trop importante.

Un prévide de 2000 secondes suivi d'un vide de 200 secondes est suffisant pour dessécher la protéine ou le peptide.

Le passage de l'azote permet de mettre le peptide sous atmosphère inerte.

Si la dissolution a été faite dans de l'eau distillée, le peptide est prêt à être dégradé, si la dissolution a eu lieu dans l'acide trifluoroacétique, une extraction au chlorobutane permet d'entraîner les dernières traces d'acide.

Le film est à nouveau séché, mis sous azote, puis resséché. La redissolution dans l'acide heptafluoroacétique pendant les 2 étapes suivantes, permet de "fixer la protéine" contre la paroi, et d'homogénéiser le film. Elle doit être suivie d'un délai, d'un prévide, d'un vide, d'une entrée d'azote et d'un passage de chlorobutane.

## II - Cycle à blanc

Avant de faire réagir la protéine, il est conseillé, d'après KOPEYAN ( 109 ) de faire un cycle à blanc sans P.I.T.C..

La durée des opérations d'injection de quadrol et d'acide conditionne directement le volume des réactifs introduits dans la coupe de réaction ; les hauteurs des liquides le long de la paroi de la coupe sont proportionnels aux volumes introduits ; ils peuvent être ajustés pendant ce cycle "à blanc".

Les durées d'admission des réactifs sont réglées de façon à ce que le niveau du quadrol dépasse très légèrement celui du dépôt, et se trouve à 0,5 mm au-dessus du niveau de l'acide ; l'utilisation d'un stroboscope facilite les observations.

### a) Vérification des temps d'arrivée des solvants

- Le quadrol arrive en 7 secondes
- L'acide arrive entre 5 et 6 secondes
- Le benzène, l'acétate d'éthyle, le chlorobutane arrivent presque immédiatement, dès qu'on entend un bruit de vanne.

### b) Vérification des débits

La quantité de chlorobutane recueilli dans les tubes du collecteur doit être de 3,6 ml.

Les volumes de benzène et d'acétate d'éthyle sont mesurés à la sortie du tube allant à la poubelle.

Pour 300 secondes programmées, le volume de benzène récupéré est de 12,5 à 13 cm<sup>3</sup>.

Pour 400 secondes, le volume d'acétate d'éthyle est de 25 ml.

Pour 190 secondes, le volume de chlorobutane recueilli est de 10 à 11 cm<sup>3</sup>, à l'étape 31.

Le temps d'arrivée des solvants jusqu'à la gorge se situe entre 25 et 30 secondes.

### III - Traitement des thiazolinones-amino-acides

Les thiazolinones, récupérées dans le collecteur de fractions sont séchées sous azote, puis reprises par 200 µl d'HCl N ; la conversion a lieu à 80°C pendant 10 minutes. On extrait 3 fois par 700 µl d'acétate d'éthyle, puis les phases organiques sont réunies et séchées sous azote ; on reprend le résidu par 20 µl d'acétate d'éthyle et on identifie les PTH-amino-acides par chromatographie sur couche mince de silica gel ou par chromatographie en phase gazeuse. L'acétate d'éthyle est conservé sur acide ascorbique (1g/l) et HCl N contient 300 µl d'éthyl mercaptan par litre.

La phase aqueuse obtenue après extraction à l'acétate d'éthyle est conservée pour identifier éventuellement les PTH-amino-acides hydrosolubles ; si l'extrait d'acétate d'éthyle ne contient aucun PTH identifiable par chromatographie sur couche mince, on effectue une électrophorèse à pH 3,9 de la phase aqueuse pour identifier les PTH-acide cystéique d'une part, les PTH-histidine et arginine d'autre part ; les réactions spécifiques de Pauly et de SAKAGUCHI permettent de déterminer le PTH-histidine ou le PTH-arginine.

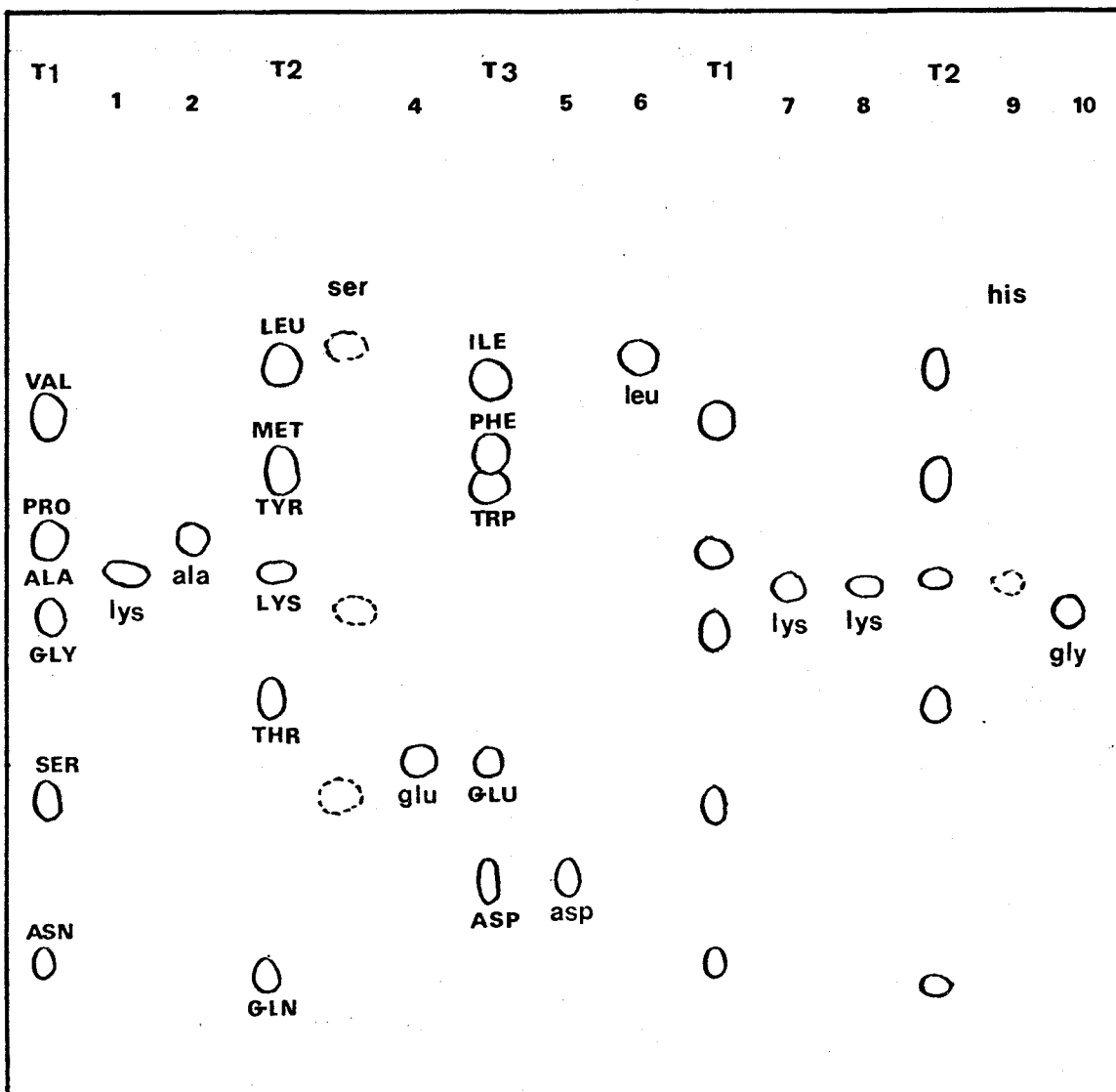
### C - RESULTATS PERSONNELS

#### 1) L'apomyoglobine de Mouton (153 résidus)

Nous avons identifié les 46 résidus d'acides aminés en position N-terminale







SYSTEME E

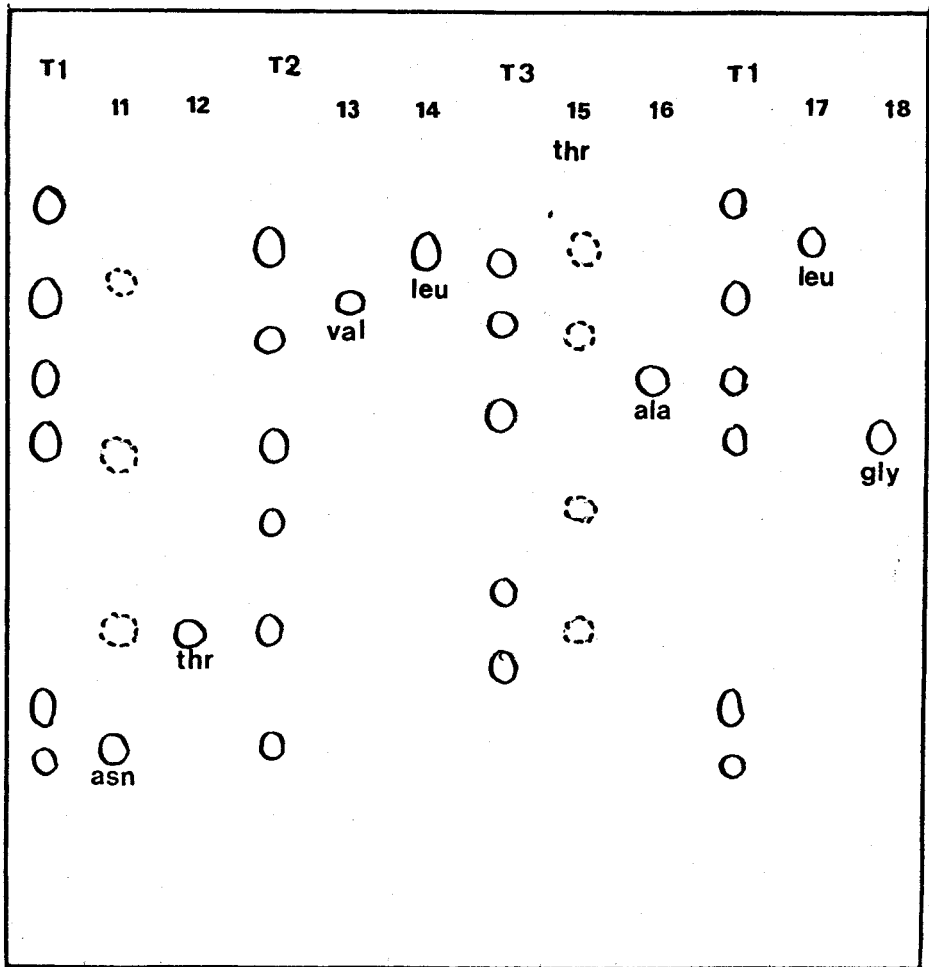
dégradation automatique du peptide

médian de la myoglobine de porc

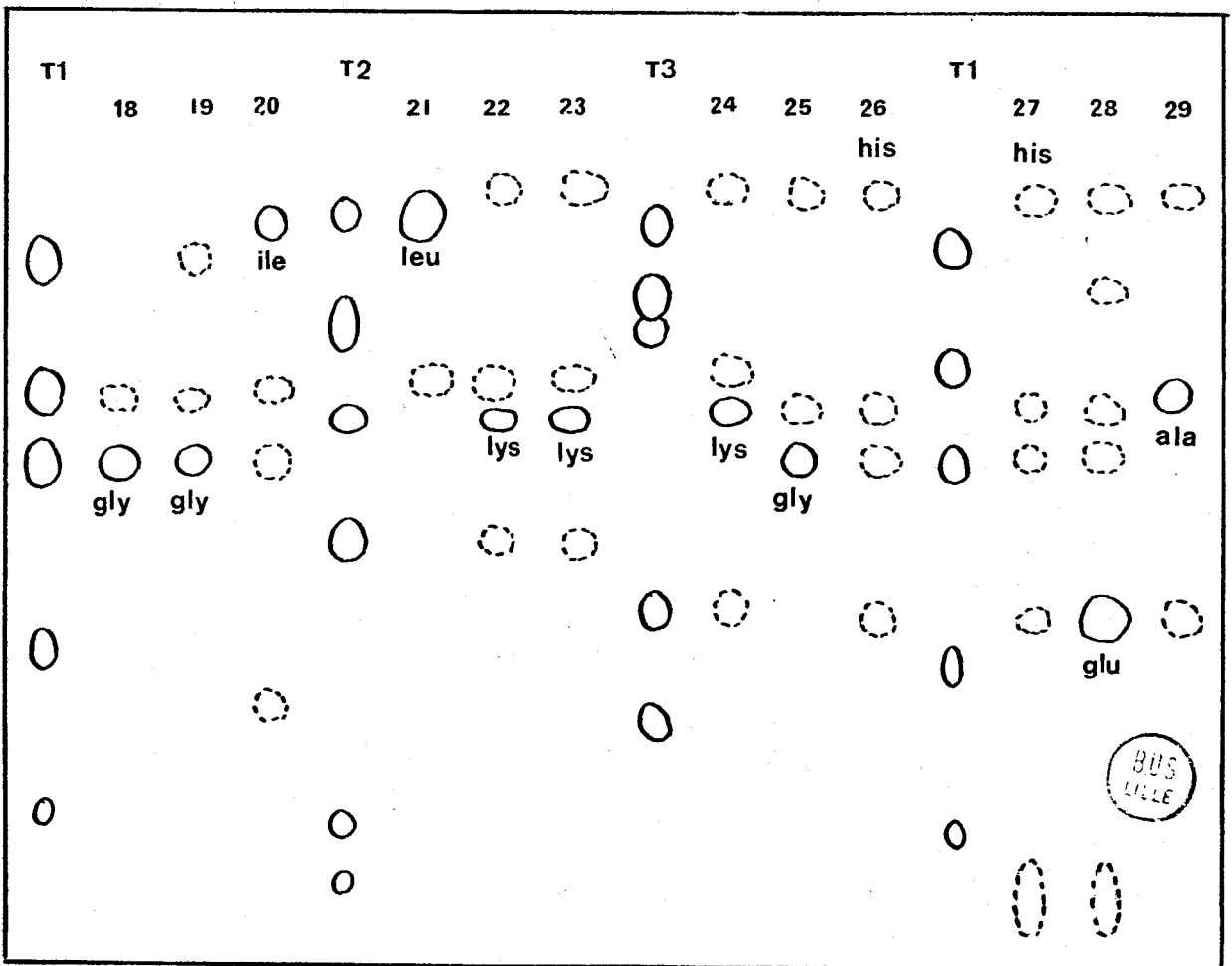
CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICA GEL

DES PTH AMINO - ACIDES



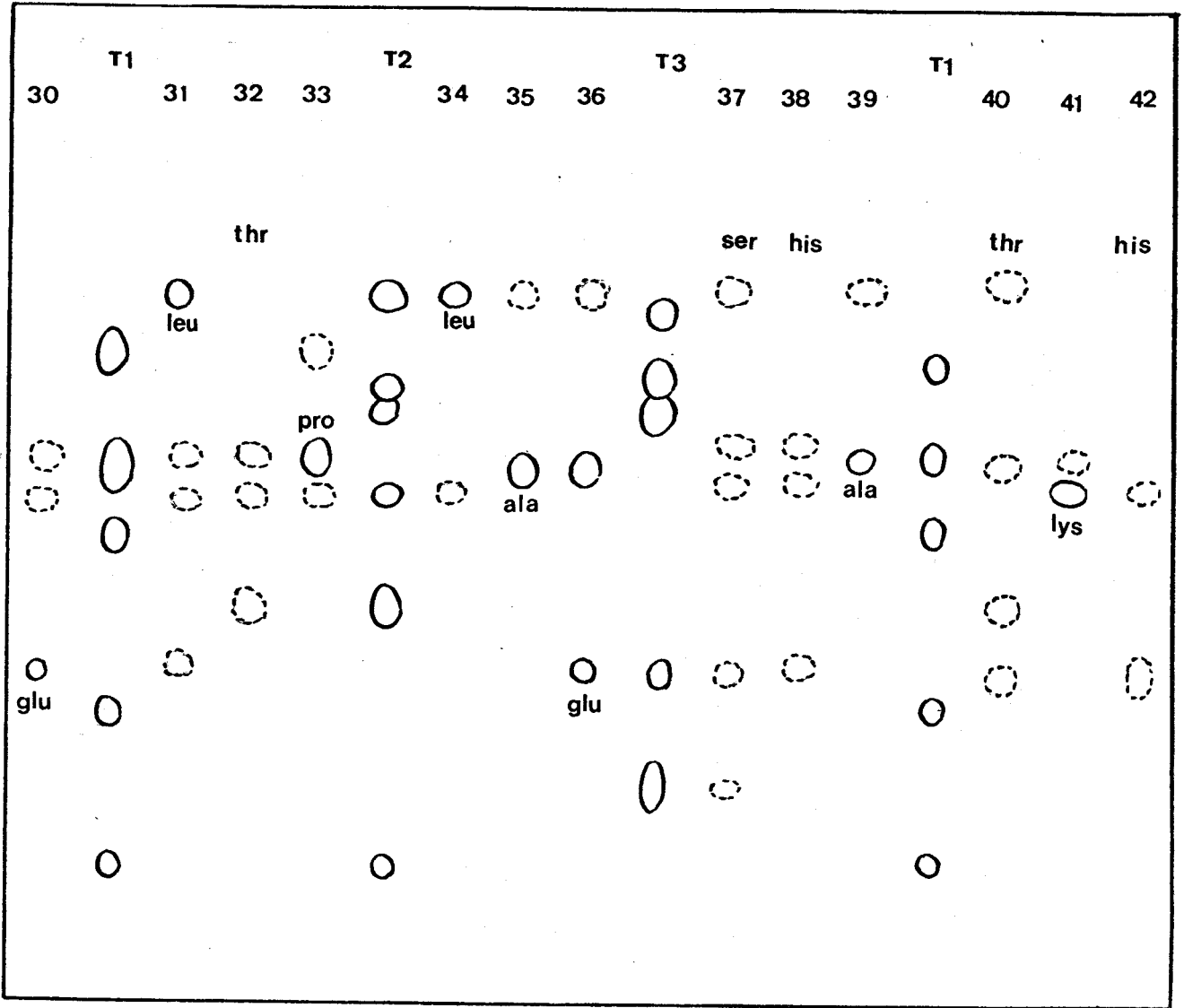


SYSTEME H



SYSTEME E





SYSTEME E



Cette séquence est celle de la partie réactive du peptide provenant de la réaction de coupure de la protéine au bromure de cyanogène. La partie N-terminale de l'histone occupée par un groupement acétyl n'est pas réactive au phénylisothiocyanate. Le bromure de cyanogène coupe la chaîne au niveau du résidu méthionine, mais la réaction n'est pas quantitative. Après la coupure, nous obtenons deux chaînes peptidiques résultant de la scission et la protéine qui n'a pas réagi ; une seule chaîne peptidique possède son groupement N-terminal libre et est susceptible de réagir avec le P.I.T.C..

Les deux peptides et la protéine n'ont pas été séparés et l'échantillon déposé dans la coupe du Séquenceur est composé du mélange. La quantité du peptide dégradé est nettement inférieure à 1  $\mu$ mole, et c'est pourquoi nous identifions seulement 18 résidus. Il est d'habitude assez aisé de reconnaître les PTH sérine et thréonine. Ils sont partiellement décomposés, mais une tache principale domine. Dans le cas présent, nous obtenons, sous lumière ultraviolette de nombreuses petites taches de même intensité.

Les structures des myoglobines de Mouton, de Porc, de Blaireau, de Chien étaient connues ; nous avons procédé à une vérification des résultats.

Chaque PTH-amino-acide est mis à migrer sur couches minces de silica gel, dans le système E ou H, précédemment décrit. Si après trempage dans une solution de ninhydrine à 0,2 p. 100, il reste encore des ambiguïtés, nous procédons à une chromatographie dans le système D.

Les résultats obtenus dépendent essentiellement de la qualité des solvants et des réactifs.

En raison de la durée des transports et de leur séjour prolongé dans les locaux de la douane, la qualité des réactifs et des solvants, en provenance des Etats-Unis est très inégale. Nous préférons actuellement utiliser des réactifs et des solvants d'origine française. Néanmoins, pour obtenir de très bons rendements et identifier 50 à 60 résidus d'acides aminés, il serait nécessaire de distiller chaque solvant et réactif avant de les utiliser.

## Les autres Séquenceurs

### A - Le Séquenceur BECKMAN

Les réserves d'azote, de réactifs et de solvants, ainsi que les deux pompes se trouvent à l'intérieur de deux compartiments dans la partie inférieure de l'appareil, l'une des pompes sert à obtenir des prévides, l'autre des vides rigoureux.

La partie supérieure est constituée du programmeur et de différents panneaux de contrôle.

- Panneau de contrôle des différentes étapes au cours d'une dégradation ;
- Panneau de contrôle des systèmes de vide, de régulation de température, de mise sous azote.

Le programme est lu par l'appareil, il est introduit sous forme de carte perforée. La modification des opérations en cours de programme nécessite un arrêt de la dégradation : la carte perforée est retirée, modifiée et réintroduite dans le lecteur.

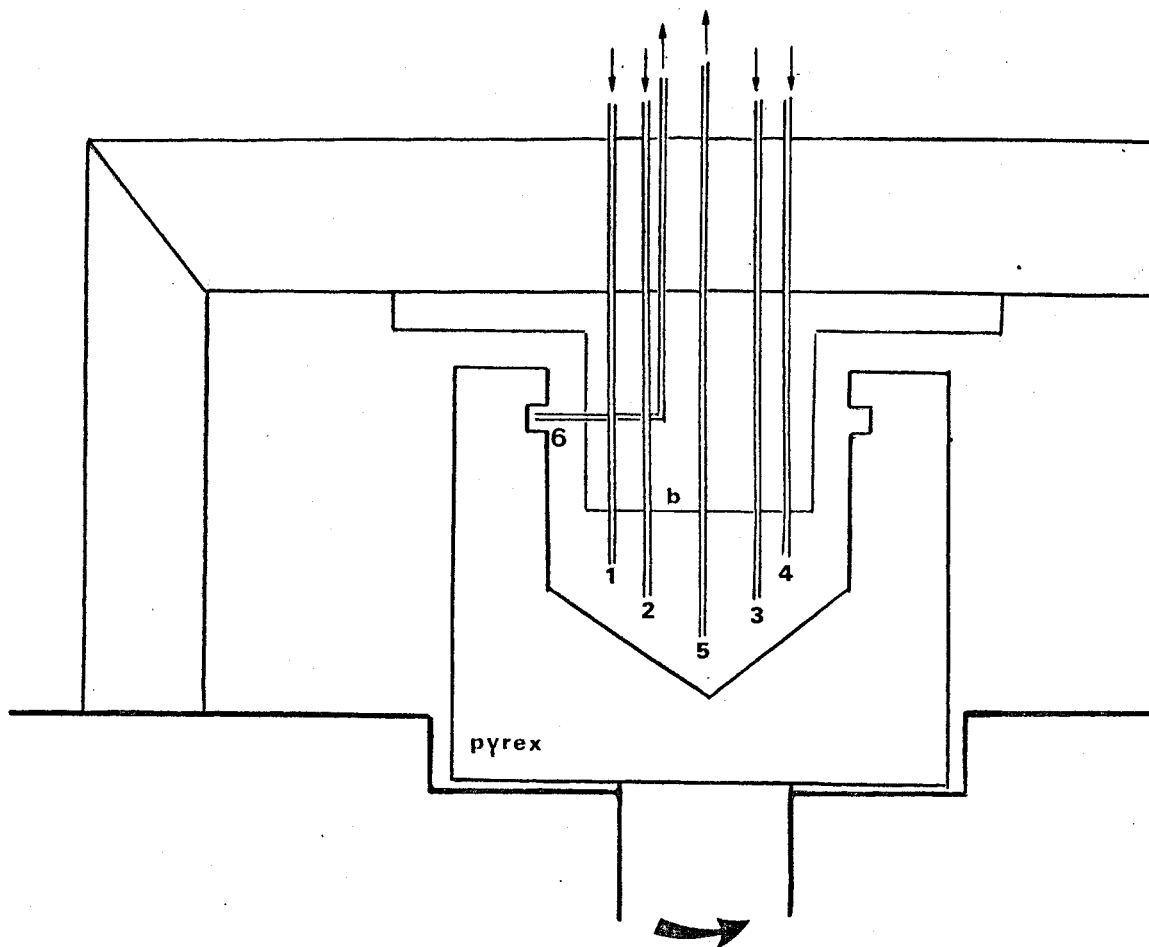
La coupe de réaction (Schéma n° 16)

Elle est située dans une enceinte dont une des faces seulement est en pyrex. Le film de protéine se trouve en partie protégé de la lumière. 5 conduits en téflon arrivent à l'intérieur de la coupe. Quatre d'entre eux amènent les réactifs et les solvants et permettent de réaliser des vides à l'intérieur de la coupe. Chacun d'entre eux est relié à une vanne qui est en communication avec une pompe, le flacon de réactif et celui de solvant. Le tube central est relié à la pompe qui permet d'obtenir des prévides.

Un sixième tube sert à collecter les liquides arrivant dans la gorge, à la partie supérieure de la coupe, ce tube est mobile, son mouvement est commandé par une vis située sur le couvercle.

Le chauffage et la régulation de la température sont assurés par un thermocouple.

La coupe de réaction peut être animée de deux vitesses de rotation (1000 et 1500 tours par minute).



1,2,3,4 : conduit en téflon , amenant solvant et réactif et servant à faire le vide

5 : conduit relié à la pompe ( previde )

6 : conduit collecteur mobile

b : bouchon en téflon



SCHEMA DE LA COUPE DU SEQUENCEUR BECKMAN

## Le collecteur

La phase benzénique dans laquelle les petits peptides peuvent être entraînés est récupérée.

La thiazolinone en solution dans le chlorobutane y est séchée.

## B - Le Séquenceur JEOL

### La coupe de réaction

Elle est réalisée en téflon, sa vitesse de rotation peut atteindre 2500 tours par minute, ce qui permet d'obtenir des films très fins de protéine.

Les solvants, les solutions de thiazolinone sont évacués ou récupérés par trop plein, par un conduit.

### Prélèvement d'une fraction de peptides résiduels

L'appareil est muni d'un système qui permet de prélever automatiquement une petite fraction du peptide résiduel dans la coupe, après chaque dégradation, afin de pouvoir la soumettre, après hydrolyse, à l'analyse des acides aminés, ou de réaliser une "dansylation" : le peptide ou la protéine est mis en solution dans la coupe de réaction avec un volume déterminé d'eau distillée. Un volume précis de la solution est aspiré, puis, après fermeture des vannes appropriées, conduit vers le collecteur pour être récupéré.

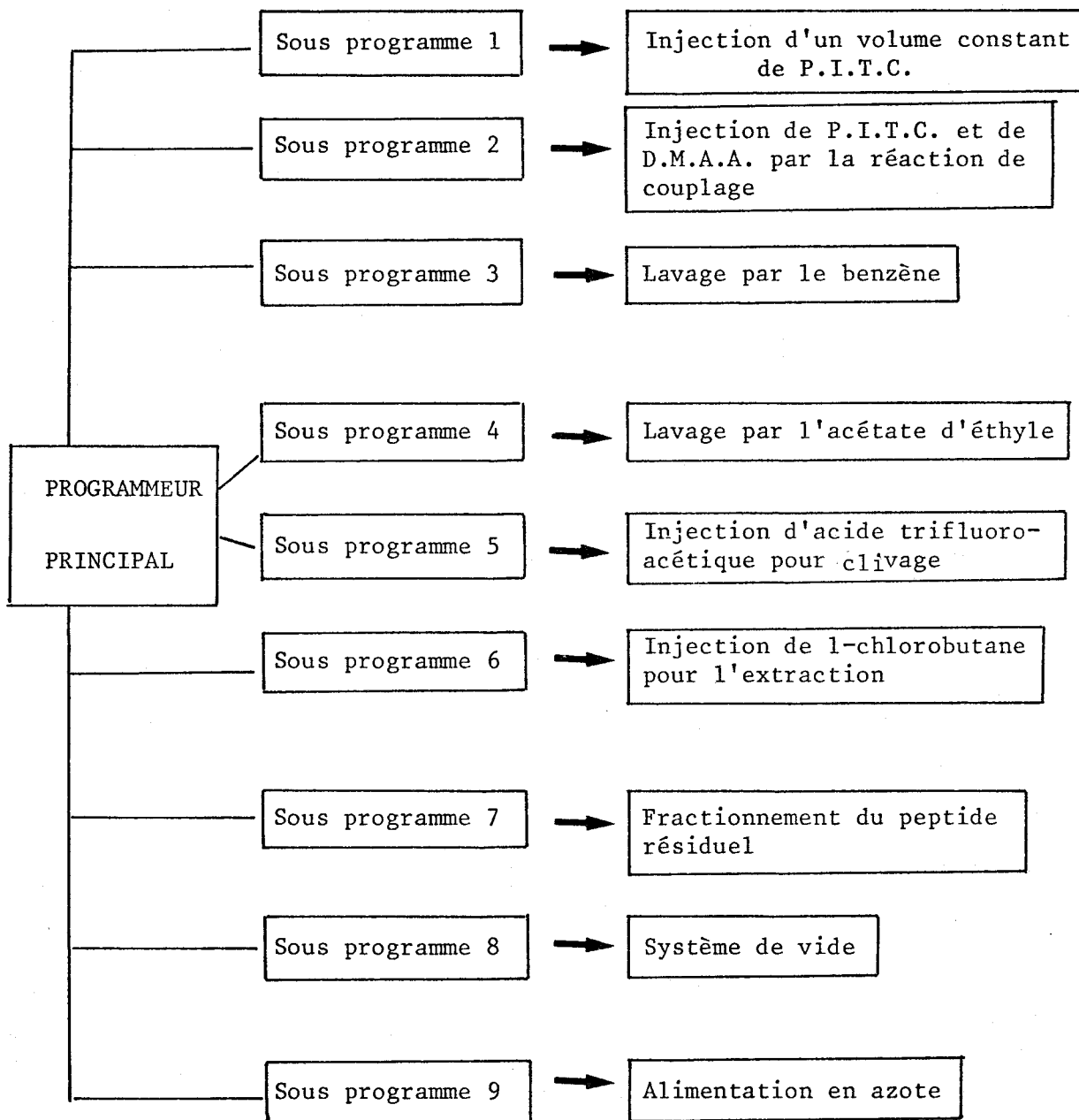
Le reste du peptide dans la coupe de réaction est séché.

### Système de vide

Les vapeurs des solvants, surtout d'acétate d'éthyle, détériorent très rapidement la pompe. L'utilisation de pièges remplis d' $N_2$  liquide et situés entre la coupe de réaction et la pompe, permet de retenir une grande partie des solvants évacués.

### Programmation

Elle est assurée par un programme principal relié à 9 "sous-programmes" qui commandent les opérations précises (Schéma n° 17 )



Le programmeur principal accomplit une lecture photoélectrique des signaux émis au passage de la carte perforée où est inscrit le programme.

Ce système de programmation est peu maniable. Si une modification veut être faite en cours d'expérience, il est nécessaire d'arrêter les opérations pour l'effectuer.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

---

Cette technique est complexe et précise, et pourrait être assimilée à celle d'un ordinateur, cependant la rencontre de difficultés n'est pas exclue lors de la manipulation. Il existe en plus des limites infranchissables de l'appareillage, des problèmes particuliers à chaque expérience : chaque protéine et aussi chaque peptide possèdent des caractères propres, et il importe souvent de trouver des conditions opératoires qui conviennent aux exigences créées par les caractéristiques de l'échantillon à dégrader.

### A - Problèmes posés par la méthode automatique

#### 1) Le prix de revient de l'appareil

Le prix d'achat de l'appareil, la nécessité d'utiliser des solvants et des réactifs rigoureusement purs, font du Séquenceur "un objet de luxe" pour le laboratoire.

#### 2) Limites de l'appareil

Au cours de chaque dégradation, les réactions ne sont pas totales, dans les meilleurs cas, le rendement est de 97-98 %. La faible partie de peptide n'ayant pas été dégradée va l'être au cours du cycle suivant. Ces réactions secondaires sont insignifiantes, étant donné la très faible quantité de peptide mise en jeu ; elles ne prennent de l'importance que parce qu'elles sont répétées au cours de chaque dégradation. Elles provoquent l'apparition de taches secondaires ou "overlapping" qui finissent par rendre impossible l'identification des PTH.

Ces réactions secondaires constituent un facteur limitatif essentiel pour les longues chaînes. Sur les chromatogrammes de silica-gel, les PTH-amino-acides qui finissent par dominer sous forme d' "overlapping" sont ceux qui se répètent le plus souvent dans la séquence.

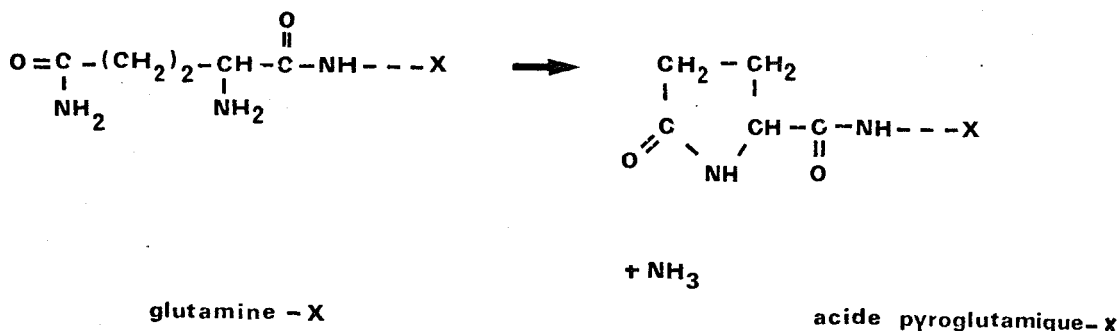
Dans certaines dégradations, le rendement maximum n'atteint



pas 97 p. 100. Celui de la synthèse du PTH-proline n'est que de 80 p. 100. Il est cependant nettement amélioré, si on élève la température dans la chambre de réaction à 56-57°C ( 110 ).

La dégradation du peptide possédant la lysine en position N-terminale se fait avec un rendement inférieur à 80 p. 100 ; dans ce cas, la réaction secondaire a immédiatement une grande importance.

D'autres réactions secondaires peuvent se produire : le résidu de glutamine peut se transformer en un résidu d'acide pyroglutamique, mais cette réaction devient réellement importante, dans des conditions de travail particulières, par exemple, un temps de réaction de clivage trop long.



D'autres réactions de ce type sont possibles : par exemple le groupement imidazole de l'histidine ou le groupement phénol de la tyrosine peut réagir avec le P.I.T.C. mais en trop faible quantité pour permettre la mise en évidence des réactions.

Cependant, d'autres réactions secondaires contribuent à l'identification des acides aminés : la glutamine et l'asparagine qui migrent de la même façon dans les systèmes E et H, ne peuvent être différenciées. Or, pendant les réactions de dégradation ces acides aminés sont partiellement hydrolysés en acide glutamique, et acide aspartique, et la séparation nette de ces acides en chroma-

tographie sur couche mince permet de les identifier.

### 3) Le Quadrol

L'emploi du Quadrol constitue une source de problèmes non négligeables. Il a été choisi, comme tampon de couplage pour la dégradation automatique, en raison des qualités suivantes: Il n'est pas volatil, donc ne provoque pas de condensations gênantes, et c'est un bon solvant des protéines. Mais c'est une amine tertiaire, de poids moléculaire élevé, très difficile à préparer et à purifier (seule la Société Pierce aux Etats-Unis le prépare à un degré de pureté convenable).

Au cours de la dégradation, il est peu soluble dans le benzène : l'extraction avec ce dernier n'est pas suffisante pour l'éliminer, et il faut extraire aussi par de l'acétate d'éthyle. Or, les peptides hydrophobes et les peptides courts sont solubles dans l'acétate d'éthyle. Leur perte représente le problème pratique le plus sérieux provoqué par l'utilisation du quadrol.

## B - Résolution partielle des problèmes

### 1) Utilisation d'autres tampons de couplage

D'autres tampons de couplage ont été étudiés pour remplacer le quadrol.

Les sels des composés tels que 
$$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \\ \diagup \\ \text{R}' \end{array} \begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{N} \\ \diagup \\ \text{R}' \end{array}$$

sont généralement insolubles dans les solvants organiques.

Les amines tertiaires 
$$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{N} \\ \diagup \\ \text{R}'' \end{array} - \text{R}'$$
 sont trop basiques pour l'usage si les 3 substituants sont des groupements alkyls.

Les allylamine et benzylamine substituées se dissocient dans le domaine de pH désiré.

BRANDT et Van HOLT (111) ont utilisé la diméthylaminopropylène pour déterminer en partie la structure de l'histone F<sub>3</sub> des érythrocytes de Poulet.

BRAUNITZER l'a également employé (112)

La diméthylbenzylamine (pka : 9,9 - P<sub>Eb</sub> : 180°) représente également une solution satisfaisante (113).

La diméthylallylamine est suffisamment volatile ( $p_{eb} = 62^{\circ}-64^{\circ}$ ) Elle a été employée comme tampon de couplage par NIALL ( 114 ), puis par THOMSEN, KRISTIANSEN, BRUNFELDT ( 115 ) pour déterminer la structure séquentielle du glucagon humain. Cependant, ces auteurs ont constaté une dégradation anormale de l'histidine en présence de diméthylallylamine. Des expériences ont montré qu'à la fin de l'étape de couplage, le pH tombe à 6 pendant le séchage du tampon ; le dérivé de l'histidine peut alors être coupé du reste de la chaîne peptidique et être extrait du lieu réactionnel, ne permettant aucune identification possible du PTH-histidine, après conversion.

Des essais de diminution de pH du tampon quadrol n'ont pas donné lieu à ce clivage anormal ; ils ont permis d'affirmer que la variation de pH n'est pas le seul facteur responsable de ces anomalies.

Un moyen de profiter des avantages de chaque tampon, en évitant de subir leurs inconvénients est de les utiliser successivement pour une détermination de structure inconnue. Une première expérience, utilisant le tampon de couplage quadrol permettrait d'avoir une vue générale de la séquence, de localiser les chutes appréciables de rendement et d'organiser un programme suivant convenable :

- Pour les premières dégradations : utilisation du tampon de couplage quadrol, programmation d'un double clivage dans le but d'éliminer le plus possible les "overlapping"
- Pour les dégradations suivantes : utilisation du tampon diméthylallylamine ; réduction importante du volume d'acétate d'éthyle et de benzène.
- Dans une troisième partie : utilisation d'un tampon diméthylallylamine moins concentré, ce qui est suffisant pour dissoudre un peptide devenu plus petit ; élimination du lavage au benzène et à l'acétate d'éthyle, afin de réduire les pertes au maximum.

## 2) Procédé de BRAUNITZER

BRAUNITZER, SCHRANK et RUHFUS ( 116 ) ( 117 ) ont apporté une autre solution au problème des peptides solubles dans les solvants organiques. Leur technique consiste à modifier les propriétés physiques des peptides. Un petit peptide tryptique contenant de la lysine en C-terminal devient plus extractible par un solvant, du fait de la

formation du groupement phénylthiocarbamylé en  $\epsilon$  (peptide hydrophobe). Avant de commencer la dégradation, on protège le peptide en greffant un réactif chimique hydrophile au niveau des groupements aminés  $\alpha$  et  $\epsilon$ .

Les quatre acides suivant peuvent être utilisés comme réactifs ainsi que leur sel de sodium

- (I) le sel de sodium de l'acide p-isothiocyano-benzène-sulfonique ;
- (II) le sel de sodium de l'acide isothiocyano-5-benzène-disulfonique 1,3.
- (III) le sel de sodium de l'acide isothiocyano-3-naphtalène-disulfonique 1,5 ;
- (IV) le sel de sodium de l'acide isothiocyano-7-naphtalène-trisulfonique 1,3,5.

La synthèse de ces composés a été réalisée ( 118 ).

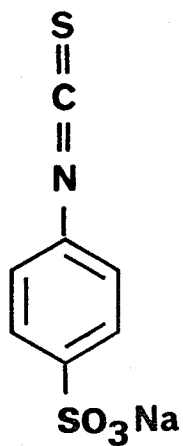
Cette technique a été employée avec succès par INMANN et coll ( 119 ) ; la séquence de 6 petits peptides (5 à 26 acides aminés) a été déterminée après avoir fait réagir les peptides avec le sulfo-4-phényl-isothiocyanate ; la dégradation de ces peptides non modifiés chimiquement n'avait donné que des informations limitées.

### 3) Modification chimique des peptides, au niveau du groupement C-terminal (FOSTER, BRUENGER et coll) ( 120)

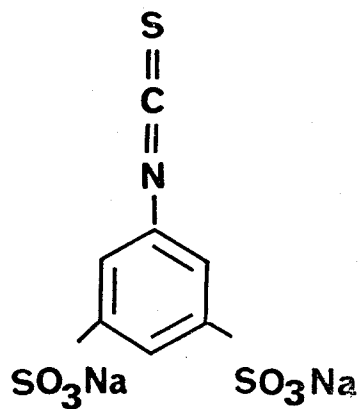
Un autre moyen de modifier les propriétés physiques des peptides consiste à greffer un composé hydrophile au niveau du résidu C-terminal. L'acide amino-2-naphtalène-disulfonique-1,5-a été fixé par l'intermédiaire d'un carbodiimide.

Si la réaction est réalisée à pH 4 en présence d'HCl 0,01 N, il n'est pas nécessaire de bloquer au préalable les groupements aminés primaires de la chaîne peptidique, dont le pK est environ de 9,5 : ils sont sous une forme protonée, seul le groupement aminé du réactif (pK < 2,5) n'est pas chargé.

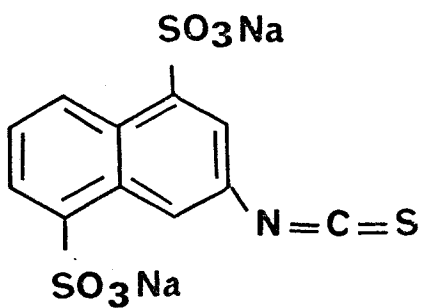
Le groupement acide carboxylique des chaînes latérales réagit de la même façon que celui du résidu C-terminal du peptide. Les acides glutamique et aspartique peuvent être identifiés après hydrolyse de la phase aqueuse, ou par déduction suivant la taille et



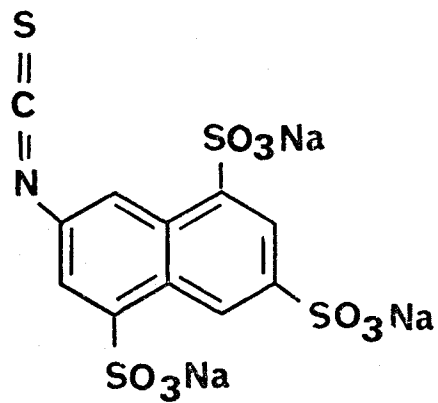
**I**



**II**



**III**



**IV**

et la composition du peptide.

La technique est simple et l'addition préalable d'un composé naphthalénique a en plus l'avantage d'augmenter la qualité du film formé par le peptide dans la coupe du séquenceur.

## C - Avantages de la méthode automatique dans l'étude de la structure covalente des protéines

Le but d'EDMAN et de BEGG, en automatisant la méthode de dégradation était de simplifier le travail du chimiste d'une part, et d'autre part d'utiliser la rapidité du procédé et les conditions opératoires parfaites pour accéder à un rendement maximum et faire des expériences non réalisables par la technique manuelle.

### 1) Rapidité de la technique

Dans le domaine de la détermination de structure primaire, le séquenceur représente un outil efficace, permettant en une seule opération une analyse rapide (60 résidus en 4 jours) d'une chaîne polypeptidique.

### 2) Détermination de longues séquences

Les possibilités de déterminer la séquence d'une chaîne longue d'acides aminés, ont entraîné des changements considérables dans les techniques d'obtention des peptides à analyser.

La méthode manuelle exige une fragmentation importante de la protéine de départ, donnant de nombreux petits peptides dont la structure peut être déterminée facilement.

Le séquenceur analyse de grands peptides obtenus le plus souvent après coupure d'une liaison par un réactif chimique.

TITANI ( 121)( 122 ) a utilisé 173 petits peptides pour déterminer la structure de la thermolysine, par les méthodes manuelles ; ces peptides provenaient de digestions enzymatiques.

6 grands fragments ont été nécessaires au séquenceur pour donner 60 p. 100 de la structure.

Les différentes méthodes chimiques de fragmentation des protéines emploient surtout le bromure de cyanogène BrCN ( 123 ) et le N-bromo-succinimide ( 124 ).

### 3) Détermination de la pureté d'une protéine

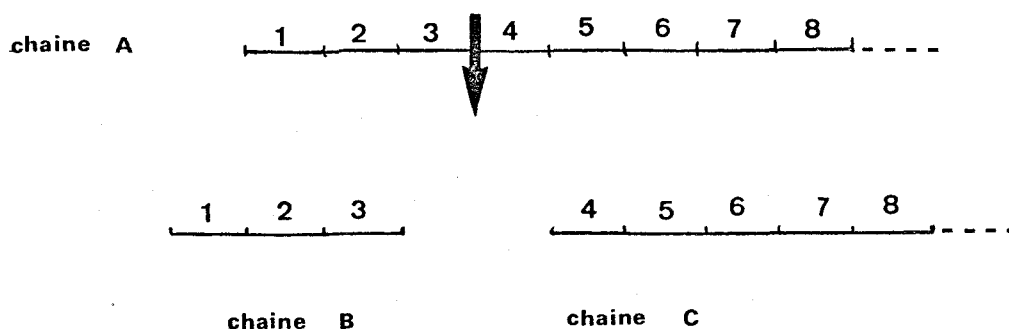
La méthode automatique peut servir à tester rapidement la pureté d'une protéine. Si après trois ou quatre dégradations, nous mettons en évidence une seule tache par cycle de PTH-amino-acide en chromatographie sur couche mince, nous pouvons déduire que la protéine est pure.

L'avantage de cette méthode sur celle de STARK (125) est d'utiliser une très petite quantité de peptide ou de protéine pour obtenir le même résultat.

L'utilisation de ce test exclut évidemment la possibilité d'avoir un mélange de protéine ou de peptide possédant un début de structure primaire identique.

#### 4) Détermination de scissions internes (126)

Nous pouvons déterminer les scissions internes susceptibles d'avoir lieu dans une chaîne polypeptidique. La coupure peut être provoquée par l'hydrolyse ou par une réaction acide sur un certain nombre de molécules.



La dégradation se fait au niveau de l'acide 1, sur la chaîne A et la chaîne B, au niveau de l'acide 4 sur la chaîne C. Nous pouvons ainsi mettre en évidence deux structures :

- la structure de la chaîne complète A qui est majeure ;  
si la réaction de scission a un faible rendement ;
- la structure de la chaîne C.

En comparant les deux structures obtenues, nous pouvons localiser la scission.

#### 5) Etudes comparatives

La méthode automatique a permis de faire automatiquement des études comparatives de structures primaires, et de déterminer certaines homologues : protéine amyloïde de l'homme, du singe et du canard (BENDITT et coll.) (127), ERICSSON et coll. (128), chaînes légères des protéines de Bence Jones (SMITHIES et coll.)



(129), différentes toxines (ROCHAT)( 130 ), segments N-terminaux du trypsinogène de boeuf et de poisson (HERMODSON et coll.)( 131 ), et myoglobines.

#### 6) Stratégie de GRAY ( 132 )

Avant de terminer l'étude sur la dégradation automatique, il nous semble utile de mentionner une stratégie originale utilisée avec succès par GRAY en 1968.

Au lieu d'effectuer la dégradation complète d'un peptide, obtenu après une coupure chimique ou enzymatique sélective, suivie d'un fractionnement et d'une purification, GRAY réalise 10 dégradations sur le mélange de peptides résultant d'un clivage spécifique sur la ribonucléase de boeuf. Deux séries de dégradations sont réalisées : la première, après coupure de la protéine par le bromure de cyanogène, la seconde après coupure par la trypsine. Les deux réactions de scission sont précédées d'une acétylation, qui permet une meilleure solubilisation et un blocage des résidus de lysine, pour assurer une coupure spécifique par la trypsine au niveau des résidus d'arginine. Après chaque dégradation, les PTH-amino-acides, rangés par ordre alphabétique dans les tableaux n° IV et V sont identifiés.

Après la coupure chimique par BrCN, d'après les résultats obtenus, le résidu d'arginine, identifié après la 3ème dégradation est suivi d'un résidu d'asparagine ou d'acide aspartique ou de thréonine. Cet acide aminé (asparagine ou acide aspartique ou thréonine) se trouve donc en position N-terminale dans un des peptides libérés par action de la trypsine : effectivement, dans la 1ère dégradation réalisée sur ces peptides tryptiques, nous identifions l'asparagine, la cystéine, l'acide glutamique et la glutamine : comme l'asparagine est le seul résidu commun identifiable à la fois après la quatrième dégradation des peptides BrCN et après la première dégradation les peptides tryptiques, l'enchaînement est donc Arg-Asn. En continuant de proche en proche, on peut ainsi établir un certain nombre de séquences peptidiques telles que

Arg-Asn-Leu-Thr-Lys

Arg-Glu-Thr-Gly-Ser

Arg-Cys

COÛPURE PAR BRCN

| dégradation           | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| MET $\leftrightarrow$ | asp | ile | ARG | ASN | cys | ala | ala | asp | arg | cys |
|                       | lys | ser | ser | asp | LEU | ARG | GLU | ser | GLY | SER |
|                       | ser | ser | thr | thr | ser | THR | LYS | THR | ser | ser |
|                       | met |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

TABLEAU IV

HYDROLYSE TRYPSIQUE

| dégradation           | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ARG $\leftrightarrow$ | ASN | his | GLY | asp | asn | lys | phe | pro | ala | ala |
|                       | cys | LEU | met | LYS | asp | ser | thr | ser | asn | cys |
|                       | GLU | lys | pro | SER | ser | thr | tyr | val | his | glu |
|                       | gln | THR | THR | val | ser | arg |     |     |     |     |



TABLEAU V

Cette technique a permis à GRAY de reconstituer la séquence totale de la ribonucléase de Boeuf (124 acides aminés) après 60 cycles de dégradations. Si la séquence totale ne peut être obtenue entièrement, notamment dans le cas de grandes protéines, des informations importantes peuvent être retenues.

Ce procédé présente beaucoup d'intérêt : il évite les pertes importantes dues à la séparation par fractionnement des peptides après la coupure spécifique ; elle est rapide et efficace. Elle n'est cependant applicable que sur des protéines qui possèdent suffisamment de liaisons peptidiques susceptibles d'être coupées. Si toutefois, ces liaisons étaient trop importantes, les peptides obtenus seraient trop nombreux, et après chaque dégradation, il serait impossible d'identifier tous les PTH-amino-acides obtenus. L'obtention de trop grandes chaînes, au contraire, ne permettrait pas de les dégrader totalement, et ne fournirait pas les informations désirées.

La réalisation d'une dizaine de dégradations seulement, permet de conserver un très bon rendement, au cours de l'expérience, et d'éviter les ambiguïtés que peut provoquer l'identification après un grand nombre de cycles.

## CONCLUSION GENERALE

---

La détermination de séquences nouvelles n'a pas été précisément le but de notre travail, nous nous sommes davantage attaché à l'utilisation, à la comparaison et parfois à l'amélioration des techniques existantes.

Les méthodes de dansylation et d'hydrolyses enzymatiques ne permettent pas de déterminer certains enchaînements d'acides aminés, tels que Asn-Asp ou Glu-Gln ; la dégradation d'Edman est alors indispensable, de plus, c'est une technique rapide et simple et dans le cas général satisfaisante.

L'avantage de cette méthode est d'obtenir des résultats précis à partir de faibles quantités de protéines. La sensibilité de la technique pourrait encore être améliorée par l'emploi de plaques de micropolyamide pour l'identification des PTH-amino-acides, ou par l'emploi d'un réactif nouveau tel que le p.isothiocyanophényl-2-phénylindone 3 ( 133 ).

Le séquenceur, bien que n'ayant pas toujours donné des résultats excellents, représente un outil de travail efficace. La dégradation automatique est techniquement supérieure à la dégradation manuelle et les possibilités d'action de l'appareil sont désormais élargies par l'emploi de tampons autres que le quadrol et par les diverses modifications chimiques des peptides. Ceci permettra sans doute dans l'avenir de déterminer rapidement les

séquences : celles d'autres myoglobines afin de pouvoir réaliser une étude comparative plus complète ou celles de protéines inconnues.

---

## CHAPITRE TECHNIQUE

---

## CHAPITRE TECHNIQUE

### TRAITEMENT DES REACTIFS ET DES SOLVANTS UTILISES DANS LA DEGRADATION D'EDMAN

- 1 - Traitement de l'acide trifluoroacétique
- 2 - Traitement de l'éther
- 3 - Traitement de l'acétate d'éthyle

### TRAITEMENT DES SOLVANTS UTILISES POUR L'IDENTIFICATION DES PTH- AMINO-ACIDES, EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICA-GEL

- 1 - Traitement du xylène
- 2 - Traitement de l'acétate de butyle
- 3 - Traitement de l'acide propionique

### METHODE d'IDENTIFICATION DES PTH-AMINO-ACIDES SUR COUCHES MINCES DE SILICA GEL

Réaction à l'iode azide

### REACTION de TOLLENS

### IDENTIFICATION DES PTH-HISTIDINE et ARGININE

- 1 - Réaction spécifique de Pauly
- 2 - Réaction spécifique de Sakaguchi

### ETUDE DES EXTREMITES C-TERMINALES

- 1 - Hydrazinolyse
- 2 - Hydrolyse par les carboxypeptidases

### HYDROLYSE PAR L'AMINOPEPTIDASE M

### HYDROLYSE PAR LES ENDOPEPTIDASES

- 1 - Hydrolyse par la trypsine
- 2 - Hydrolyse par la chymotrypsine
- 3 - Récupération des peptides après hydrolyse

## TECHNIQUE DE DANSYLATION

- 1 - Synthèse du DNS-peptide
- 2 - Hydrolyse du DNS-peptide
- 3 - Identification des DNS-amino-acides

Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silica-gel

Chromatographie sur feuille de polyamide



TRAITEMENT DES REACTIFS ET SOLVANTS UTILISES DANS LA DEGRADATION  
D'EDMAN

1 - Traitement de l'acide trifluoroacétique

L'acide trifluoroacétique (Carlo Erba R.P.) est distillé à reflux avec  $\text{CrO}_3$  (10g/litre) jusqu'à ce que la couleur de la solution ne varie plus. Il est distillé, puis à nouveau mis à reflux, avec  $\text{CrO}_3$  afin de s'assurer qu'il n'y a plus d'oxydation possible. Il est ensuite séché sur  $\text{CaSO}_4$  anhydre filtré, puis distillé.

PEB : 72-73°C.

2 - Traitement de l'éther (élimination des peroxydes)

2 litres d'éther technique sont distillés à reflux, pendant 1/2 heure en présence de chlorure stanneux (50g/litre).

L'éther est lavé, une première fois avec une solution à 20 % de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (100 ml/litre), puis 5 fois avec de l'eau bidistillée. Il est ensuite filtré et distillé.

PEB : 34°6 C.

Il est conservé sur  $\text{FeSO}_4$  anhydre.

3 - Traitement de l'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle (Fluka AG puriss) est agité, avec une solution aqueuse de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  plusieurs fois dans une ampoule à décanter (200 ml/litre), puis avec une solution saturée de  $\text{CaCl}_2$ .

La phase organique est laissée sous agitation avec  $\text{KMnO}_4$  solide (1g/litre), pendant une nuit.

Elle est ensuite lavée avec de l'eau distillée, plusieurs fois, puis mise à sécher sur  $\text{CaSO}_4$  anhydre.

On filtre et on distille.

PEB : 77°.

L'acétate d'éthyle est traité de façon à éliminer les traces d'alcool, qui par oxydation, risquerait de donner des aldéhydes. Ces derniers gênent la réaction de couplage, en formant des bases de Schiff, avec les groupements amines primaires.

TRAITEMENT DES SOLVANTS UTILISES POUR L'IDENTIFICATION DES PTH-AMINO-ACIDES, EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICA-GEL

1 - Traitement du xylène

Le xylène (Carlo Erba - R.P.) est agité pendant 1/2 heure avec  $H_2SO_4$  concentré (100 ml pour 1 litre de xylène). On procède à 3 extractions, puis la phase organique est lavée avec de l'eau, puis séchée sur des pastilles de potasse pendant au moins une nuit, et distillée.

PEB : 139°C.

2 - Traitement de l'acétate de butyle

L'acétate de butyle (Carlo Erba - R.P.) est distillé.

PEB : 126°C.

3 - Traitement de l'acide propionique

Il est distillé à reflux pendant 4 heures, en présence de  $CrO_3$  (10 g/800 ml d'acide), puis filtré et distillé.

PEB : 140°C.

METHODE D'IDENTIFICATION DES PTH-AMINO-ACIDES SUR COUCHES MINCES DE SILICA-GEL

Réaction à l'iode azide (SJOQUIST) (134 )

3 solutions sont préparées extemporanément

Solution a : 1,27 g d'iode et 8,3 g de K.I. sont dissous dans 100 ml d'eau.

Solution b : 3,2 g d'azide de sodium sont dissous dans 100 ml d'eau.

Solution c : solution d'amidon à 1 % dans l'eau.

On réalise un mélange de la solution a et de la solution b (volume/volume). On vaporise la plaque de silica gel avec la solution c, puis avec le mélange (solution a + solution b). Les PTH-amino-acides apparaissent sous forme de taches blanches sur un fond jaune, qui devient rapidement rouge, puis brun.

Réaction de Tollens (test de contrôle de pureté des solvants et tampon utilisés dans le Séquenceur)

Les solvants : chlorobutane, acétate d'éthyle, benzène et le tampon quadrol sont contrôlés pour vérifier l'absence d'aldéhydes.

Le test est effectué dans une chambre noire. 1 ml d'une solution d'AgNO<sub>3</sub> à 10 % (poids/volume) et 1 ml d'une solution de NaOH à 10 % (poids/volume) sont mélangés dans un tube à essais, et une solution d'ammoniaque est ajoutée goutte à goutte, jusqu'à ce que le précipité soit dissous. A cette solution, on ajoute 2 ml de l'échantillon (le quadrol et le n.propanol sont d'abord dilués (en proportion égale dans de l'eau distillée).

Quand les solutions ne sont pas miscibles, le tube est agité de temps en temps.

Si des aldéhydes se trouvent dans l'échantillon, ils sont oxydés : la réaction suivante a lieu



La solution noircit et un miroir d'argent se forme sur les parois du tube.

IDENTIFICATION DES PTH-HISTIDINE et ARGININE

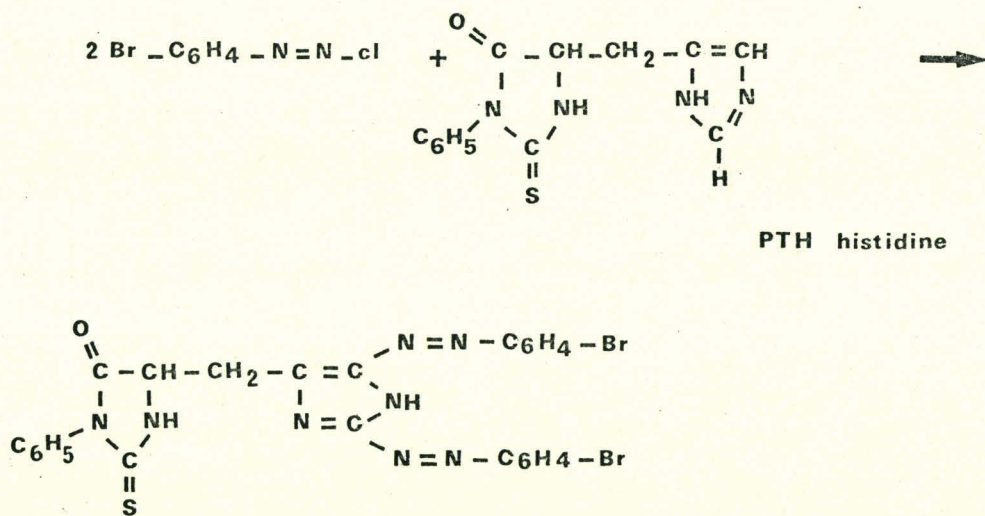
1 - Réaction spécifique de PAULY

Cette réaction permet de mettre en évidence l'histidine, les dérivés de l'histidine et les peptides à histidine.

§ Principe

Les sels de diazonium aromatiques réagissent au niveau du noyau imidazole de l'histidine (ou de ses dérivés) pour donner des composés azoïques colorés.

La réaction est la suivante :



§ Technique

La technique utilisée est celle de BALDRIDGE et LEWIS (135 ). L'échantillon à analyser est déposé sur une bande de papier whatman.

On réalise extemporanément un mélange à volumes égaux

- d'une solution d'acide sulfanilique à 1 g dans une solution d'HCl (8 ml dans 100 ml d'eau).
- d'une solution de nitrite de sodium à 0,69 % dans l'eau.

Le papier est trempé dans le mélange et après séchage, dans une solution aqueuse de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 10 p. 100.

L'histidine ou un de ses dérivés est mis en évidence par une coloration rouge.

## 2 - Réaction spécifique de SAKAGUCHI (mise en évidence de l'arginine ou du PTH-arginine)

### § Principe

La réaction consiste en un blocage du groupement guanidine libre de l'arginine (ou du PTH-arginine).

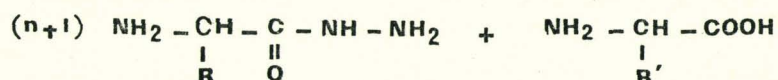
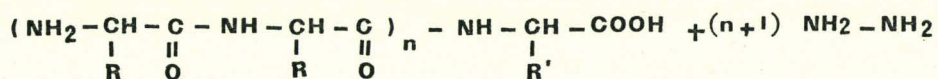
La technique utilisée est celle de JEPSON et SMITH ( 136 ).

Le papier où a été déposé l'échantillon est trempé dans une solution acétonique de 8-hydroxyquinoléine à 0,1 p. 100, puis séché. Il est ensuite trempé à nouveau dans une solution de BrONa (obtenue après addition de brome (0,2 ml) dans une solution de NaOH 0,5 N (100 ml)). Si l'échantillon contient de l'arginine (ou un de ses dérivés), une coloration orange apparaît.

## ETUDE DES EXTREMITES C-TERMINALES

### 1 - Hydrazinolyse

L'hydrazinolyse permet de déterminer le résidu C-terminal d'une chaîne peptidique. Sous l'action de l'hydrazine, les liaisons peptidiques sont rompues et les acides aminés apparaissent sous forme d'hydrazides. La réaction est la suivante :



La technique utilisée est celle de NIU et FRAENKEL-CONRAT ( 137 ).

#### § Technique

1 µmole de peptide au préalable séché sous vide en présence d'anhydride phosphorique et 1 ml d'hydrazine sont placés dans un tube qui est ensuite scellé. Le tout est laissé pendant 16 heures à 70°C, puis séché sous vide sur H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Le résidu est repris par 1 ml d'eau.

L'hydrazide est extraite de la solution avec le benzaldéhyde ; la phase organique est écartée. La phase aqueuse est extraite 2 fois avec 1 ml d'éther sans peroxyde, puis congelée et lyophilisée.

Le résidu est repris par 200 µl d'eau et déposé sur papier whatman 3 pour subir une électrochromatographie en pH 2,4 dans le système butanol-acide acétique-eau (4/1/5).

#### 2 - Hydrolyse par les carboxypeptidases

Les carboxypeptidases hydrolysent les acides α-aminés ayant une fonction carboxylique libre. L'activité de la carboxypeptidase A est nulle si l'acide aminé C-terminal est la proline, l'hydroxyproline, la lysine ou l'arginine, ou si l'acide aminé qui le précède est l'acide glutamique ou la proline. La carboxypeptidase

B hydrolyse les peptides dont le résidu C-terminal est la lysine, l'arginine ou l'ornithine.

1  $\mu$ mole de peptide est dissoute dans 2 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7,5 (100 ml d'ammoniaque 0,2 M que l'on ajuste à pH 7,5 par de l'acide acétique glacial). La solution peptidique est placée à 38°C pendant 20 minutes. On ajoute 25  $\mu$ l de la solution de carboxypeptidase.

La réaction est arrêtée par congélation et lyophilisation. Les acides aminés libérés sont dosés à l'analyseur d'acides aminés, ou peuvent être identifiés par électrochromatographie à pH 2,4.

#### HYDROLYSE PAR L'AMINOPEPTIDASE M

L'aminopeptidase M hydrolyse toutes les liaisons peptidiques du côté N-terminal à l'exception de la proline. Elle permet le dosage des amides.

Le peptide (0,5 à 1  $\mu$ mole) est dissous dans du tampon bicarbonate 0,1 M, pH 8. A 1 ml de la solution peptidique, on ajoute 100  $\mu$ l de la solution d'aminopeptidase M, dans un tube conique. Après agitation, l'hydrolyse est effectuée à 38°C pendant 24 heures. L'hydrolysats est lyophilisé.

Les amides sont dosées à l'autoanalyseur Jeol.

#### HYDROLYSE PAR LES ENDOPEPTIDASES (par comparaison avec l'étude de la myoglobine de Cheval)

##### 1 - Hydrolyse par la trypsine

La trypsine est traitée par le chlorure de diphénylcarbamyl (ERLANGER et COHEN) ( 138 ) de façon à être dépourvue d'activité chymotrypsique, ce qui provoquerait des coupures parasites dans le peptide étudié.

L'hydrolyse trypsique est réalisée de la façon suivante : 100 mg de peptide sont dissous dans 10 ml de tampon sesquicarbonate d'ammonium à 1 p. 100 ; le pH du tampon est ajusté à 8,5 par addition d'ammoniaque.

La trypsine est ajoutée en une seule fois, de façon à obtenir un rapport enzyme/substrat (poids/poids) de 4 p. 100. L'hydrolyse est poursuivie pendant 2 h 30 à 38°C, sous agitation et dans l'obscurité. Elle est arrêtée par congélation, l'hydrolysats est lyophilisé.

## 2 - Hydrolyse par la chymotrypsine

La chymotrypsine est traitée, d'après la technique de SHAW et al. (139 ). 100 mg de peptide sont dissous dans 10 ml de tampon sesquicarbonate d'ammonium à 1 p. 100 (pH 8,75).

La chymotrypsine est ajoutée en une seule fois, de façon à obtenir un rapport enzyme/substrat (poids/poids) de 2 p. 100.

L'hydrolyse a lieu pendant 6 heures à 38°C sous agitation et à l'obscurité. Elle est stoppée par congélation et l'hydrolysats est lyophilisé.

## 3 - Récupération des peptides après hydrolyse

Le couplage électrochromatographique permet de séparer et de récupérer les différents peptides obtenus (BISERTE et al.) (140 ) La technique consiste à réaliser dans une première dimension, une électrophorèse en pH 3,9 (Pyridine/acide acétique/eau - 30/100/4870) sur papier whatman n° 3. On procède ensuite, dans une deuxième dimension, à une chromatographie descendante dans un système butanol/pyridine/acide acétique/eau (150/100/30/120).

On identifie les taches peptidiques, après révélation dans une solution de ninhydrine à 2 p. 100 dans l'acétone. Les taches sont récupérées, découpées, cousues sur un morceau de papier whatman et éluées par l'acide acétique à 8 p. 100.



TECHNIQUE DE DANSYLATION (GRAY et HARTLEY) (141 )

1 - Synthèse du DNS-peptide

20  $\mu$ l de la solution peptidique (2 à 5 nanomoles dissous dans 20  $\mu$ l d'eau) sont placés dans un petit tube de verre (20 mm de long x 6 mm de diamètre), et mélangés à 20  $\mu$ l de solution de bicarbonate de sodium 0,2 M et à 40  $\mu$ l d'une solution de 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfochlorure (chlorure de dansyl) dans l'acétone.

L'ensemble est mis à réagir pendant une heure à l'obscurité au bain-marie à 45°C, puis desséché à 60°C en présence d'acide sulfurique, de soude et d'anhydride phosphorique.

2 - Hydrolyse du DNS-peptide

Le résidu sec est repris par 50  $\mu$ l d'HCl 5,6 N, et le tube à dansylation est placé dans un tube à hydrolyse scellé (35 cm de long x 1,5 cm de diamètre), le tiers inférieur du tube, isolé par un étranglement est rempli d'HCl 5,6 N.

L'hydrolyse a lieu à 105°C pendant 5 à 15 heures.

L'hydrolysate est séché sous vide sur  $P_2O_5$ ,  $H_2SO_4$ , NaOH à 60°C, puis repris par 50  $\mu$ l d'un mélange acétone/acide acétique (3/2) en vue d'effectuer l'identification.

3 - Identification des DNS-amino-acides

§ Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silica gel

La technique utilisée est celle de GROS et LABOUESSE ( 142 )  
Nous déposons les 50  $\mu$ l dans le coin gauche de la plaque (20 cm x 20 cm) à 3 cm de chacun des bords.

La première chromatographie se fait dans le sens inverse de celui du coulage du silica gel.

|                | SOLVANT   | PROPORTION DU MELANGE | TEMPS DE MIGRATION |
|----------------|---|-----------------------|--------------------|
| 1ère migration | Benzène/<br>pyridine/<br>ac.acétique                          | 80/20/5               | 45 minutes         |
| 2ème migration | Toluène/<br>monochlorhy-<br>drine du<br>glycol/<br>ammoniaque | 30/50/20              | 75 minutes         |

Figure n° III

§ Chromatographie sur feuille de polyamide

Cette chromatographie a l'avantage sur la précédente d'être plus rapide et plus sensible.

Des feuilles de plastique (15 cm x 15 cm) (Schleicher et Schüll) recouvertes de micropolyamide sur les deux faces sont découpées en 9 carrés de 5 cm de côté.

2 µl de la solution de DNS-amino-acides repris par 15 µl d'acétone et 10 µl d'acide acétique sont déposés dans un angle à 3 mm de chacun des bords de la plaque.

La chromatographie est réalisée successivement dans les 2 ou 3 solvants décrits par HARTLEY ( 144 ).



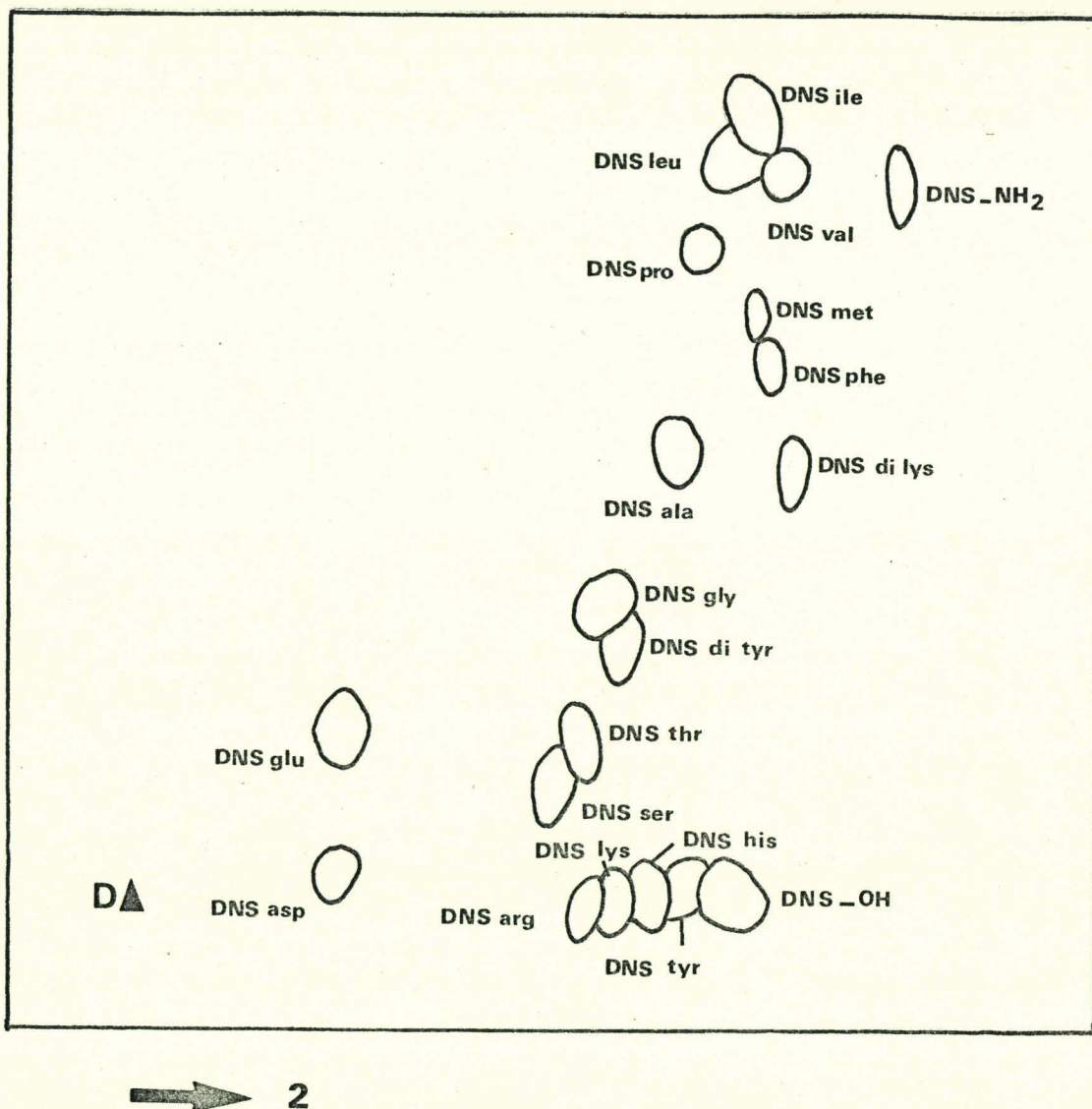
|                | Mélange de solvants utilisés                   | proportions V/V | Temps de migration |
|----------------|--|-----------------|--------------------|
| 1ère migration | Ac.formique/<br>eau                            | 1,5 p. 100      | 10 minutes         |
| 2ème migration | benzène/ac.<br>acétique                        | 9/1             | 15 à 20<br>minutes |
| 3ème migration | acétate d'éthy-<br>le/méthanol/ac.<br>acétique | 20/1/1          | 15 minutes         |

La 2ème migration a lieu perpendiculairement à la première et la 3ème, dans le même sens que la seconde.

La dernière migration est nécessaire pour séparer certains groupes d'acides aminés tels que les groupes sérine-thréonine ; acides aspartique-glutamique : lysine - arginine - histidine.

Figure n° IV





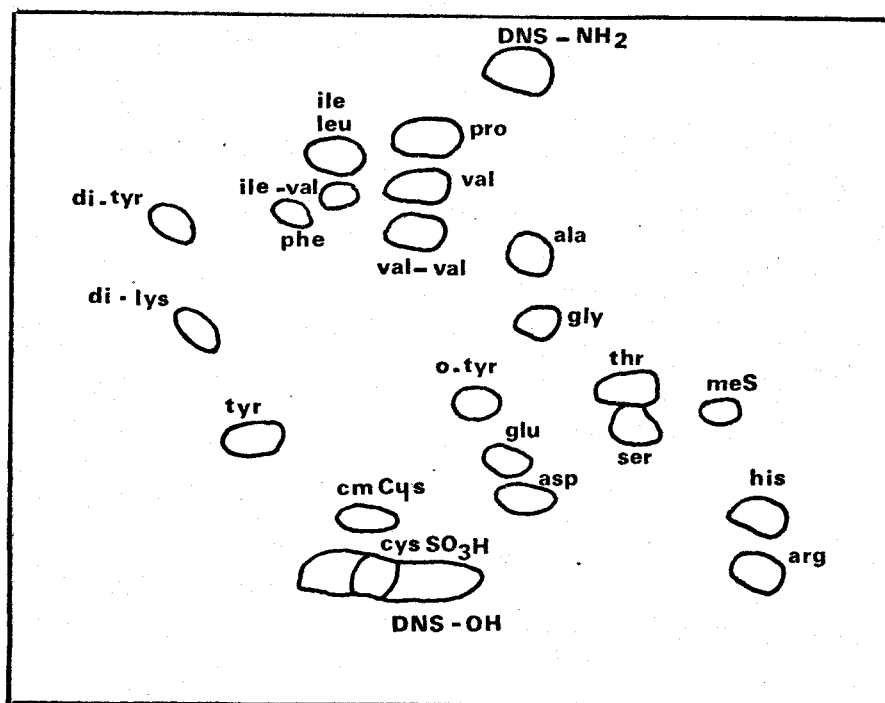
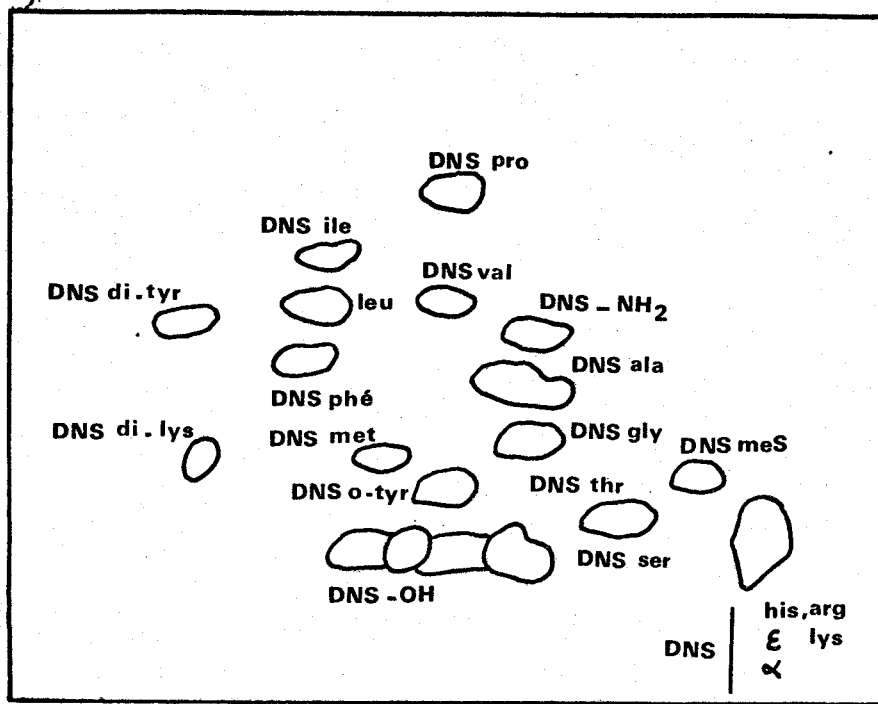
1 : BENZENE - PYRIDINE - ACIDE ACETIQUE ( 80 - 20 - 5 )

2 : TOLUENE - CHLORO 2 ETHANOL - AMMONIAQUE ( 30 - 50 - 20 )

**Chromatographie des dansyl-amino acides sur  
couche mince de gel de silice**



d'après Gros et Labouesse ( 143 )



- 1 : acide formique - eau 1,5 - 100  
 2 : benzène - acide acétique 9 - 1  
 3 : acétate d'éthyle - méthanol - acide acétique 20 - 1 - 1



CHROMATOGRAPHIE DES DANSYL-AMINO ACIDES SUR COUCHE MINCE

DE POLYAMIDE

Hartley (145 )

## **BIBLIOGRAPHIE**

---

Les références bibliographiques sont données dans l'ordre alphabétique de leurs auteurs. Les numéros entre parenthèses indiquent l'ordre d'apparition dans le texte.

- ABDERHALDEN, E. et BROCKMAN, H. (1930) *Biochem. J.* 225, 386 (16)
- AFRICA, B. et CARPENTER, F.H. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 113 (82)
- ANDERSEN, W. (1954) *Acta Chem. Scand.* 8, 1733 (18)
- BALRIDGE, R.C. et LEWIS, H.B. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 169 (135)
- BENDITT, E.P., ERIKSEN, N., HERMODSON, M.A. et ERICSSON, L.H. (1971) *Febs Letters* 19, 169 (127)
- BERGMANN, M., MICKLEY, A. et KANN, E. (1927) *Ann.* 458, 40 (15)
- BRANDT, W.F. et Von HOLT, C. (1972) *Febs Letters* 23, 357 (74, 111)
- BRAUNITZER, G., MÜLLER, R.G., HILSCHMANN, N., HILSE, K., HOBOM, G., RUDLOFF, V. et LIEBOLD, B. (1961) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 325, 283 (7)
- BRAUNITZER, G., RUDLOFF, V., HILSE, K., LIEBOLD, B. et MÜLLER, R. (1960) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 320, 283 (6)
- BRAUNITZER, G. et SCHRANK, B. (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 417 (112)
- BRAUNITZER, G., SCHRANK, B. et RUHFUS, A. (1970) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 1589 (92, 116)
- BRAUNITZER, G., SCHRANK, B., RUHFUS, A., PETERSEN, S. et PETERSEN, U. (1971) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1730 (117, 118)
- BROMER, W.W., SINN, L.G., STAUB, A., BEHRENS, O.K. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 3858 (3)
- CHERBULIEZ, E., SUSSMANN, A.R., RABINOWITZ, J. (1961) *Helv. Chem. Acta* 44, 219 (87)
- CONDSEN, R., GORDON, A.H., MARTIN, A.J. et SYNGE, R.L. (1947) *Biochem. J.* 41, 596 (1)
- DAUTREVAUX, M., HAN, K., BOULANGER, Y. et BISERTE, G. (1962) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 44, 965 (12)

- DELANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L. et BONNER, J. (1969)  
J. Biol. Chem. 244, 319 (49)
- DELANGE, R.J. et SMITH, E.L. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2143 (48)
- DJERASSI, C., UNDHEIM, K., SHEPPARD, R.C., TERRY, W.G. et SJÖBERG, B.  
(1961) Acta Chem. Scand. 15, 903 (85)
- DOPHEIDE, T.A., MOORE, S., STEIN, W.H. (1967) J. Biol. Chem. 242,  
1833 (42)
- DROBNICA, L. et AUGUSTIN, J. (1965) Coll. Czechosl. Chem. Commun.  
30, 1221 (93)
- EAKER, D. Communication personnelle (56)
- EDMAN, P. (1949) Arch. Biochem. Biophys. 22, 475 (21)
- EDMAN, P. (1950) Acta Chem. Scand. 4, 283 (22, 79)
- EDMAN, P. (1953) Acta Chem. Scand. 7, 700 (23)
- EDMAN, P. (1956) Nature 177, 667 (31, 45, 51)
- EDMAN, P. (1957) Proc. Roy. Australian Chem. Inst. 434 (24)
- EDMAN, P. et BEGG, G. (1967) Europ. J. Biochem. 1, 80 (59, 64, 101,  
102)
- EDMAN, P. et KLUH, I. Résultats non publiés (62)
- EDMAN, P. et SJÖQUIST, J. (1956) Acta Chem. Scand. 10, 1507 (26, 61)
- ELZINGA, M., LAI, G.Y. et HIRS, C.H. (1968) Arch. Biochem. Biophys.  
123, 353 (43, 45)
- ELZINGA, M., HIRS, C.H. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 123, 361  
(44)
- ERICSSON, L.H. et BENDITT, E.P. résultats non publiés (128)
- ERLANGER, B.F. et COHEN, W. (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85, 348,  
(138)
- FAIRWELL, T., BARNES, W.T., RICHARDS, F.F. et LOVINS, R.E. (1970)  
Biochemistry 9, 2260 (77)
- FOSTER, J.A., BRUENGER, R., HU, C.L., ALBERTSON, K. et FRANZBLAU, C.  
(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 70 (120)



- FRAENKEL-CONRAT, H., HARRIS, J.I., LEVY, A.L. (1955) dans "Methods of Biochemical Analysis" 2, 425 (33)
- GRAY, W.R. (1968) Nature, 220, 1300 (132)
- GRAY, W.R. et HARTLEY, B.J. (1963) Biochem. J. 89, 379 (60, 141)
- GROS, G. et LABOUESSE, B. (1969) Europ. J. Biochem. 7, 463 (142, 143)
- GROSS, E. (1967) dans "Methods in Enzymology" II, 238 (123)
- GUHA, A., LAI, C.Y., HORECKER, B.L. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 692 (36)
- HAGENMAIER, H., EBBIGHAUSEN, W., NICHOLSON, G. et VOETSCH, W. (1970) Z. Naturforsch. 25, 681 (76)
- HAN, K., DAUTREVAUX, M., CHAILA, X. et BISERTE, G. (1970) Europ. J. Biochem. 16, 465 (13)
- HAN, K., TETAERT, D., MOSCHETTO, Y., DAUTREVAUX, M., KOPEYAN, C. (1972) Europ. J. Biochem. 27, 585 (14)
- HARRIS, J.I. et LI, C.H. (1954) J. Am. Chem. Soc. 76, 3607 (4, 34)
- HARRISON, S.C. et BLOUT, E.A. (1965) J. Biol. Chem. 240, 299 (11)
- HARTLEY, B.J. (1970) Biochem. J. 119, 805 (144, 145)
- HERMODSON, M.A., ERICSSON, L.H., TITANI, K., NEURATH, H. et WALSH, K.A. (1972) Biochemistry 11, 4493 (108, 110, 126)
- HERMODSON, M.A., TYE, R.W., REECK, G.R., NEURATH, H. et WALSH, K.A. (1971) Febs Letters 14, 222 (131)
- ILSE, D. et EDMAN, P. (1963) Australian J. Chem. 16, 411 (50)
- INAGAMI, T. et MURAKAMI, K. (1972) Anal. Biochem. 47, 501 (63)
- INMAN, J.K., HANNON, J.E. et APPELLA, E. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 2075 (75, 119)
- IVANOV, C.P. et MANCHEVA, I.N. (1973) Anal. Biochem. 53, 420 (133)
- IWANAGA, S., WALLEN, P., GRÖNDAHL, N.J., HENSCHEN, A. et BLOMBÄCK, B. (1969) Europ. J. Biochem. 8, 189 (58)

- JENSEN, H. et EVANS, E.A. (1935) J. Biol. Chem. 108, 1 (17)
- JEOL Chromatography (1972) 2 (73, 98, 100)
- KATSUKI, S., SCOTT, J.E., YAMASHINA, J. (1965) Biochem. J. 97,  
25c (91)
- KENDREW, J.C., DICKERSON, R.E., STRANDBERG, B.E., HART, R.G.,  
DAVIES, D.R., PHILLIPS, D.C. et SHORE, V.C. (1960)  
Nature, 185, 422 (10)
- KONIGSBERG, W. (1967) dans "Methods in Enzymology" II, 461 (107)
- KONIGSBERG, W. et HILL, R.J. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2547 (39, 40)
- KOPEYAN, C. Communication personnelle (109)
- KOPPLE, K.D. et BACHLI, E. (1959) J. Org. Chem. 24, 2053 (106)
- KOSTLA, V., MORAVEK, L. et SORM, F. (1970) Europ. J. Biochem. 13,  
447 (55)
- KRISTIAN, P. et DROBNICA, L. (1966) Coll. Czechosl. Chem. Commun.  
31, 1333 (94)
- KULBE, K.D. (1971) Anal. Biochem. 44, 548 (66, 68)
- LAURENT-TABUSSE, G., GIRAUD, N. et LIMOZIN, N. (1972) Biochimie  
54, 809 (54)
- LAURSEN, R.A. (1966) J. Am. Chem. Soc. 88, 5344 (89, 103)
- LAURSEN, R.A. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 663 (86, 104)
- LAURSEN, R.A. (1971) Europ. J. Biochem. 20, 89 (105)
- LAVIER, W.G. (1961) Biochim. Biophys. Acta 53, 469 (88)
- LEQUIN, R.M. et NIALI, H.D. (1972) Biochim. Biophys. Acta 257, 76 (96)
- LEVY, A.L. (1954) Biochim. Biophys. Acta 15, 589 (81)
- LI, C.H., GESCHWIND, I.I., COLE, R.D., RAACKE, I.D., HARRIS, J.I.  
et DIXON, J.S. (1955) Nature 176, 687 (51)
- LIGHT, A., GLAZER, A.N. et SMITH, E.L. (1960) J. Biol. Chem. 235,  
3159 (65)

- MARGOLIASH, M. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 2161 (37)
- NIALL, H.D. et EDMAN, P. (1962) *J. Gen. Physiol.* 45, 185 (52)
- NIALL, H.D., KEUTMANN, H.T., COPP, D.H. et POTTS, J.T. (1969)  
*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 64, 771 (114)
- NIALL, N.D., KEUTMANN, H.T., SAUER, R., HOGAN, M., DAWSON, B.,  
AURBACH, G. et POTTS, J.T. (1970) *Hoppe-Seyler's Z.  
Physiol. Chem.* 351, 1586 (124)
- NIU, C.I. et FRAENKEL-CONRAT, H. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* 77, 5882  
(137)
- PECHERE, J.F., CAPONY, J.P., RYDEN, L. et DEMAILLE, J. (1971)  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1106 (57)
- PERRIN, D.D. (1965) dans "Dissociation constants of organic bases  
in aqueous solutions", 118 (113)
- PERUTZ, M.F., ROSSMANN, M.G., COLLIS, A.F., MUIRHEAD, H., WILL, G.  
et NORTH, A.C. (1960) *Nature* 185, 416 (9)
- PISANO, J.J., BRONZERT, T.J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5597  
(69, 72, 99)
- PISANO J.J., BRONZERT, T.J. et BREWER, H.B. (1972) *Anal. Biochem.*  
45, 43 (70, 71)
- PLAQUET, R., BISERTE, G., SCHOONAERT, T., BOULANGER, P. et  
PAYSANT, P. (1960) *J. Chromatog.* 3, 25 (140)
- RAMACHANDRAN, L.K., EPP, A. et Mc CONNELL, W.B. (1955) *Anal. Chem.*  
27, 1734 (84)
- RAMACHANDRAN, L.K. et Mc CONNELL, W.B. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78,  
1255 (97)
- REITH, W.S. et WALDRON, N.M. (1954) *Biochem. J.* 56, 116 (95)
- RICHARDS, F.F., BARNES, W.T., LOVINS, R.E., SALOMONE, R. et  
WATERFIELD, M.D. (1969) *Nature* 221, 1241 (90)
- ROCHAT, H., ROCHAT, C., KOPEYAN, C., MIRANDA, F., LISSITZKY, S.  
et EDMAN, P. (1970) *Febs Letters* 10, 349 (130)
- ROCHAT, H. , ROCHAT, C., MIRANDA, F., LISSITZKY, S. et EDMAN, P.  
(1970) *Europ. J. Biochem.* 17, 262 (53)

- SANGER, F. (1945) *Biochem. J.* 39, 507 (19)
- SANGER, F., THOMPSON, E.O., et TUPPY, H. (1952) 2nd Congr. Intern. Biochim., Chim. Biol. IV - Symposium Hormones proteines et dérivés des protéines - Paris (1952), 26 (2)
- SCHROEDER, W.A. (1967) dans "Methods in Enzymology" 11, 445 (35)
- SHAW, E., MARES-GUIA, M. et COHEN, W. (1965) *Biochemistry* 4, 2219 (139)
- SJOQUIST, J. (1953) *Acta Chem. Scand.* 7, 447 (25, 28, 30, 134)
- SJOQUIST, J. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 41, 20 (27, 29, 32)
- SMITH, I. (1953) *Nature*, 171, 43 (136)
- SMITHIES, O., GIBSON, D., FANNING, E.M., GOODFLIESH, R.M., GILMAN, J.G. et BALLANTYNE, D.L. (1971) *Biochemistry* 10, 4912 (80, 129)
- SMYTH, D.G., STEIN, W. et MOORE, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 227 (8)
- STARK, G.R. (1967) dans "Methods in Enzymology" 11, 125 (125)
- STARK, G.R. et SMYTH, D.G. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 214 (20)
- SUMMERS, M.R., SMYTH, G.W. et OROSZLAN, S. (1973) *Anal. Biochem.* 53, 624 (67)
- SUN, T. et LOVINS, R.E. (1972) dans "Organic mass.spectrometry" 6, 39 (78)
- TAKAHASHI, K. (1971) *J. Biochem (Japon)* 70, 617 (38)
- THOMSEN, J., KRISTIANSEN, K., BRUNFELDT, K. et SUNDBY, F. (1972) *Febs Letters* 21, 315 (115)
- TITANI, K., HERMODSON, M.A., ERICSSON, L.H., WALSH, K.A. et NEURATH, H. (1972) *Biochemistry* 11, 2427 (121)
- TITANI, K., HERMODSON, M.A., ERICSSON, L.H., WALSH, K.A. et NEURATH, H. (1972) *Nature (London)* 238, 35 (22)
- TRAVIS, J. et LIENER, I.E. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1967 (41)

VAN ORDEN, H.O. et CARPENTER, F.H. (1964) Biochem. Biophys. Res.  
commun. 14, 399 (83)

WU, T.C., CRUMM, C. et SAFFRAN, M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6043  
(46, 47)

