

SUMMARY

The reactions of isocyanic acid and of thiocyanic acid with the products of AMADORI rearrangements are described. Thiocyanic acid, especially, is well suited for the characterization of fructosamines. By etherification of the mercapto group and exposure to oxidizing agents, the 2-mercapto-imidazoles can be used for preparation of certain imidazole derivatives which are otherwise difficult to obtain, *e.g.* 4-formyl-imidazole.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

220. Strépo­gé­ni­nes de la caséine**II. Valyl-glutaminy­l-valyl-leucyl-prolyl-prolyl-prolyl-valyl-prolyl-glutaminy­l-lysine (TB- γ 2/6) et alanyl-glutaminy­l-prolyl-valyl-prolyl-tyrosyl-alanyl-prolyl-prolyl-valyl-glutaminy­l-arginine (TB- γ 2/5)**

par **Pierre Baudet, Rolf Rössler et Emile Cherbuliez**

(6 VI 60)

I. Introduction

Dans un mémoire précédent¹⁾, nous avons décrit les méthodes permettant d'isoler d'un hydrolysats tryptique de caséine, quelques polypeptides neutres et basiques, à action strépo­gé­nique.

Le présent mémoire est consacré à l'étude de deux strépo­gé­ni­nes basiques de la fraction TB- γ 2 de cet hydrolysats. Rappelons que la fraction que nous avons appelée TB- γ est obtenue à partir des peptides basiques par une électrophorèse à haut voltage à pH 6,5. Fractionnée à son tour par électrophorèse également, mais à pH 2, on sépare de TB- γ , TB- γ 2 qui renferme toute l'activité. Cette dernière fraction contient les deux strépo­gé­ni­nes TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 dont l'étude fait l'objet de ce mémoire.

Après leur localisation par la ninhydrine sur une bande découpée dans le phérogramme, les fractions strépo­gé­ni­ques sont éluées à partir du papier encore humide, de façon à prévenir leur fixation irréversible sur le support de cellulose. Les éluats sont congelés puis lyophilisés.

Au moyen de 12 électrophorèses pH 6,5 par jour, nous obtenons en 3 semaines (au total 240 opérations), à partir de 9 g de la fraction basique (TB), 0,166 g de TB- γ , fournissant à son tour par électrophorèse à pH 2 0,089 g de TB- γ 2. Ce cycle est répété de façon à fournir périodiquement une quantité suffisante de TB- γ 2 pour qu'on puisse passer aux dernières étapes de la purification, conduisant aux 2 strépo­gé­ni­nes pures.

En pratique, après la réunion de 240 éluats contenant TB- γ , le fractionnement de cette quantité est poursuivi en 8 portions par électrophorèse à pH 2, à 33 volts/cm. On obtient ainsi la fraction TB- γ 2 (qui contient toute l'activité).

¹⁾ PIERRE BAUDET & EMILE CHERBULIEZ, *Helv.* 43, 904 (1960).

TB- γ 2 est fractionné par chromatographie sur papier, en principe selon les indications données dans notre mémoire précédent¹⁾, mais au lieu de chromatographies bidimensionnelles, on effectue 2 chromatographies monodimensionnelles successives (fig. 1, 1801, resp. a + b et a + c), pour se prêter aux nécessités du fractionnement préparatif. Les 0,089 g de TB- γ 2 mentionnés plus haut peuvent être fractionnés sur 3 ou 4 feuilles de papier. On obtient ainsi les strépegénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 à l'état pur. Il est arrivé cependant que des préparations de TB- γ 2/5 soient contaminées par un peu de TB- γ 2/6, et que cette dernière contienne encore une faible quantité d'un peptide à Rf plus bas (TB- γ 2/2 formé d'acide glutamique, d'acide aspartique, d'alanine, de thréonine, avec la sérine comme acide aminé N-terminal et la lysine comme acide aminé C-terminal).

Tableau 1. Rendements et activités des fractions strépegéniques et des strépegénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6

Substance	Poids en mg mis en œuvre	% de l'hydrolysât partiel d'après la teneur en azote	Activité strépegénique en unités WOOLLEY par mg
Hydrolysât partiel	8560	100	20–25
Fraction basique TB	6000	70	25
Tb- γ	104	1,21	40
TB- γ 2	56	0,65	60
TB- γ 2/5	9,7	0,11	80
TB- γ 2/6	4,3	0,05	80

Toutes ces fractions peuvent être conservées sans altération de leurs activités à température ordinaire, à l'abri de l'humidité; elles ne sont pas altérées non plus après autoclavage de 20 min de leur solution dans l'eau distillée ou en milieu tamponné à pH 6,8 à 115°.

La pureté chromatographique de ces deux strépegénines est contrôlée par 2 chromatographies bidimensionnelles (voir partie expérimentale). La révélation à la ninhydrine ne montre qu'une seule tache pour chacune des strépegénines.

La chromatographie bidimensionnelle selon LEVY²⁾ ou ROCKLAND³⁾, ou encore une chromatographie dans une direction suivie de l'électrophorèse⁴⁾ dans l'autre direction (voir partie expérimentale), de leur hydrolysât chlorhydrique intégral, démontre la présence chez TB- γ 2/5, d'acide glutamique, d'alanine, de valine, de tyrosine, de proline et d'arginine, et chez TB- γ 2/6, d'acide glutamique, de valine, de leucine, de proline et de lysine; il n'y a pas de cystine, puisque, après oxydation performique de ces strépegénines à -10° , selon HIRS⁵⁾, on ne trouve pas d'acide cystéique dans leurs hydrolysats intégraux et puisque la réaction de FOLIN & MARENZI⁶⁾ sur les peptides natifs est négative. L'absence de tryptophane est démontrée par chromatographie bidimensionnelle selon LEVY²⁾, après hydrolyse barytique qui ménage cet acide aminé. L'isoleucine est également absente puisque la chromatographie selon WORK⁷⁾ de la fraction leucinles + valine provenant de l'électrophorèse

²⁾ A. L. LEVY & D. CHUNG, *Analyt. Chemistry* 25, 396 (1953).

³⁾ L. B. ROCKLAND & J. C. UNDERWOOD, *Analyt. Chemistry* 26, 10 (1954).

⁴⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, non publié.

⁵⁾ C. H. W. HIRS, *J. biol. Chemistry* 219, 611 (1959).

⁶⁾ O. FOLIN & A. D. MARENZI, *J. biol. Chemistry* 83, 103 (1929).

⁷⁾ E. WORK, *Biochim. biophys. Acta* 3, 400 (1940).

à pH 2 de l'hydrolysats chlorhydrique intégral ne montre que valine et leucine. L'hydrolyse des 2 strépogénines par l'acide chlorhydrique 2N à 100° durant 120 min libère de l'ammoniac qui est fixé ensuite par entraînement dans de l'acide sulfurique puis dosé à la ninhydrine⁸⁾.

Le dosage des acides aminés de TB- γ 2/5 et de TB- γ 2/6 est effectué après leur hydrolyse chlorhydrique intégrale, soit par chromatographie bidimensionnelle des acides dinitrophényl-aminés (sauf la DNP-proline) et détermination photométrique à 360 m μ ⁹⁾, soit après chromatographie, électrophorèse et dosage à la ninhydrine selon WUNDERLY¹⁰⁾. Le dosage de la proline est effectué dans l'hydrolysats intégral après chromatographie et électrophorèse, à l'aide du réactif de CHINARD¹¹⁾ et selon un procédé complémentaire que nous décrivons, ou bien après dinitrophénylation, par la mesure de l'absorption à 385 m μ . La tyrosine est détruite en grande partie durant l'hydrolyse chlorhydrique intégrale des peptides isolés des phérogrammes ou chromatogrammes, du fait des impuretés glucidiques issues des papiers de chromatographie et d'électrophorèse. Les lavages appropriés préliminaires des papiers diminuent cette destruction sans l'empêcher complètement, aussi la tyrosine est-elle dosée chez TB- γ 2/5 natif, par le réactif à l' α -nitroso- β -naphtol¹²⁾.

Tableau 2. Composition des strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6

Strépogénine	Acides aminés	Nombre de restes ^{a)}	
		dosage DNP ⁹⁾	dosage ninhydrine ¹⁰⁾
TB- γ 2/5	ala	2	2
	glu	2	2
	val	2	2
	tyr	1 ^{b)}	1 ^{b)}
	pro	4	4
TB- γ 2/6	arg	1	1
	val	3	3
	glu	2	2
	leu	1	1
	lys	1	1

^{a)} On admet un nombre de restes entier lorsque les dosages des acides aminés donnent des fractions moléculaires qui ne s'écartent pas de plus de 10% d'un nombre entiertie (voir page 1816).
^{b)} Dosé par la méthode à l' α -nitroso- β -naphtol¹²⁾.

La teneur en proline de ces 2 strépogénines est particulièrement élevée: 40% chez TB- γ 2/5 et 38% chez TB- γ 2/6. La quantité de valine est également importante (29% chez TB- γ 2/6 et 16% chez TB- γ 2/5).

⁸⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, *Helv.* 41, 1613 (1957).

⁹⁾ G. KOCH & W. WEIDEL, *Z. physiol. Chem.* 303, 213 (1956).

¹⁰⁾ B. PERNIS & CH. WUNDERLY, *Biochim. biophys. Acta* 11, 209 (1953).

¹¹⁾ F. P. CHINARD, *J. biol. Chemistry* 199, 91 (1952); W. TROLL & J. LINDSLEY, *ibid.* 215, 655 (1955).

¹²⁾ U. COOPER, *J. biol. Chemistry* 196, 227 (1952); M. MARTIN, *Bull. Soc. Chim. biol.* 39, 78 (1957).

Le fait que les résidus d'acides aminés dans chacun de ces deux polypeptides sont présents en nombre entier est encore un argument en faveur de la pureté de nos produits, qui s'ajoute aux indications chromatographiques. Il en va de même des résultats obtenus lors de la détermination des acides aminés N- et C-terminaux, qui sont uniques pour chacune des strépogénines en question. L'acide aminé N-terminal est mis en évidence selon SANGER¹³⁾ après chromatographie bidimensionnelle⁹⁾, et l'acide aminé C-terminal est identifié soit après hydrazinolyse¹⁴⁾ soit après action de la carboxypeptidase¹⁵⁾, par chromatographie d'une part et électrophorèse d'autre part.

La libération de la lysine et de l'arginine respectivement, acides aminés C-terminaux, par la carboxypeptidase A se fait très lentement. Cela est en accord avec la spécificité d'action de cet enzyme. La présence de lysine d'une part et d'arginine d'autre part comme acides aminés C-terminaux est en accord avec ce que l'on sait de la spécificité d'action de la trypsine, au moyen de laquelle les strépogénines ont été préparées à partir de la caséine.

Tableau 3. *Acides aminés N- et C-terminaux des strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6*

Strépogénine	Acide aminé N-terminal	Acide aminé C-terminal
TB- γ 2/5	ala	arg
TB- γ 2/6	val	lys

L'hydrazinolyse selon AKABORI¹⁴⁾ des deux strépogénines libère l'acide aminé C-terminal de TB- γ 2/5, l'arginine, tandis que cette opération ne donne pas de résultat avec TB- γ 2/6.

La présence de deux restes d'ammoniac dans chacun des polypeptides, implique l'existence de 2 fonctions amides simples. Trois carboxyles sont disponibles dans l'ensemble pour chacune des 2 strépogénines, 2 provenant des résidus d'acide glutamique et le 3ème de l'acide aminé C-terminal. Or, ce dernier est libéré par la carboxypeptidase dans sa forme non amidée, son carboxyle est donc libre dans les peptides natifs; il ne reste alors que la possibilité que les deux fonctions amides appartiennent aux restes d'acide glutamique sous forme de restes de glutamine. Par ailleurs, le caractère basique de ces strépogénines implique que les 2 carboxyles des restes glutamiques soient masqués.

Nous avons établi la constitution des deux strépogénines par l'analyse des peptides fournis par leur dégradation partielle. Comme les strépogénines contiennent chacune plusieurs fois les mêmes restes de certains acides aminés (acide glutamique, valine, proline, alanine), on ne pouvait pas, pour les peptides d'hydrolyse partielle, se contenter d'effectuer l'analyse qualitative de leurs produits d'hydrolyse, mais il fallait les doser. Nous utilisons dans ce but la méthode à la ninhydrine de WUNDERLY¹⁰⁾ ou la méthode par dinitrophénylation de KOCH & WEIDEL⁹⁾. Toutes les fois que le nombre de résidus trouvés par ces deux méthodes ne s'écarte pas de plus de 10% d'un nombre entier, on admet qu'ils sont présents en ce nombre entier. Ces

¹³⁾ F. SANGER, *Biochem. J.* 39, 507 (1945).

¹⁴⁾ S. AKABORI, K. OHNO & K. NARITA, *Bull. chem. Soc. Japan.* 25, 214 (1952).

¹⁵⁾ H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS & A. L. LEVY, *Methods of biochemical Anal.* 2, 397.

nombres seront donnés entre parenthèses à côté du nom de l'acide aminé, abrégé selon BRAND¹⁶⁾.

Nous avons utilisé plusieurs procédés d'hydrolyse partielle: dégradation contrôlée par la carboxypeptidase, par l'acide chlorhydrique concentré à 37°, par la subtilisine (enzyme protéolytique de *Bacillus subtilis*), et par la chymotrypsine en ce qui concerne TB- γ 2/5. Les fragments peptidiques engendrés par ces hydrolyses sont fractionnés en ampholytes acides, neutres et basiques, au moyen d'électrophorèse au pH 6,5, puis les fractions acides et neutres sont soumises à une nouvelle électrophorèse à pH 2, ce qui les subdivise dans la plupart des cas en de nombreux peptides. Après leur localisation par la ninhydrine, le réactif de SAKAGUCHI¹⁷⁾, l' α -nitroso- β -naphthol¹⁸⁾ ou l'isatine¹⁸⁾ sur une bande témoin, les peptides sont élués.

II. Hydrolyse à la carboxypeptidase A

La carboxypeptidase A cristallisée 3 fois, de WORTHINGTON, 0,016–0,017 unité ANSON par mg, est lavée par de l'eau froide 3 fois de suite, par mise en suspension suivie de centrifugation. Ces lavages sont destinés à débarrasser l'enzyme d'acides aminés contaminants, formés par l'autodigestion de la carboxypeptidase. Un traitement de l'enzyme au monofluorophosphate d'isopropyle¹⁵⁾, pour inactiver des protéinases pancréatiques, présentes à l'état de traces dans la préparation commerciale de la carboxypeptidase A cristallisée, n'a pas été nécessaire dans notre cas, puisque nous n'observons aucune protéolyse parasite de TB- γ 2/5 et de TB- γ 2/6, cela même après des temps d'incubation très prolongés (72h).

L'hydrolyse de TB- γ 2/5 et de TB- γ 2/6 par la carboxypeptidase A est très lente; l'arginine et la lysine respectivement ne commencent à apparaître qu'après 7 heures d'incubation. Il est connu¹⁹⁾ que ces acides aminés en position C-terminale ralentissent beaucoup l'hydrolyse de la liaison peptidique dans laquelle ils sont engagés. En fait, si nous avons utilisé la carboxypeptidase A et non la carboxypeptidase B qui agit beaucoup plus rapidement que l'A sur ces liaisons, c'est qu'à l'époque de l'exécution des travaux décrits dans ce mémoire, on ne connaissait qu'une seule carboxypeptidase pancréatique, qui a été nommée carboxypeptidase A seulement après la découverte de la carboxypeptidase B²⁰⁾. Chez les 2 stréptogénines étudiées, l'hydrolyse ne procède pas plus rapidement une fois cette première étape franchie; chez TB- γ 2/5, de la glutamine et un peu d'acide glutamique apparaissent à la 12me heure, et un peu de valine, à la 28me heure. Puis l'hydrolyse s'arrête pratiquement. Chez TB- γ 2/6, une libération de très peu de glutamine et d'acide glutamique est observée à la 12me heure et ici encore l'hydrolyse ne se poursuit pas. Or, nos 2 polypeptides contiennent chacun 4 restes de proline; comme on sait que la carboxypeptidase ne libère pas la proline C-terminale, on peut penser que l'arrêt observé de la dégradation est dû à la présence de proline en troisième position C-pré-terminale chez TB- γ 2/5 et en seconde position chez TB- γ 2/6. Quant à l'apparition d'un

¹⁶⁾ E. BRAND & J. T. EDSALL, *Ann. Rev. Biochemistry* 16, 224 (1947).

¹⁷⁾ S. SAKAGUCHI, *Japan med. J.* 7, 278 (1948).

¹⁸⁾ R. ACHER, M. JUTISZ & C. FROMAGEOT, *Biochim. biophys. Acta* 8, 442 (1952).

¹⁹⁾ J. I. HARRIS, *Chem. Soc. (London), Spec. Public. N° 2*, 271 (1955); J. GILLIS, P. SPITNIK & E. KATCHALSKI, *Research Council Israël, Spec. Public. N° 1*, 268 (1952).

²⁰⁾ J. E. FOLK, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 3541 (1956).

peu d'acide glutamique, elle s'explique comme suit: la glutamine libérée par la carboxypeptidase A au pH 8, se cyclise partiellement en acide pyrrolidonecarboxylique qui, au moment de l'acidification de l'hydrolysate au pH 3, est hydrolysé en partie en acide glutamique. La glutamine témoin, dans nos conditions de travail, s'est comportée de la même façon.

Des observations qui précèdent on peut conclure à la présence des séquences C-terminales suivantes: pour TB- γ 2/5 ... *val. glm.*²¹⁾ *arg. OH*, et pour TB- γ 2/6 ... *glm. lys. OH*. Cela fixe en même temps la grandeur moléculaire de ces 2 stréopogénines. En effet, après élimination resp. de l'arginine et de la lysine C-terminales, les peptides résiduels sont neutres et ne contiennent plus l'acide aminé en question. Son reste ne se trouve donc qu'une seule fois dans la molécule de chacune de ces 2 stréopogénines.

III. Hydrolyses partielles par l'acide chlorhydrique

Pour la dégradation de longues chaînes peptidiques au hasard, on a préconisé l'hydrolyse partielle par l'acide chlorhydrique concentré (12N) à 37°²²⁾. Elle fournit un certain nombre de peptides courts, à côté d'acides aminés. Les proportions des uns et des autres dépendent essentiellement de la nature du peptide dégradé²³⁾.

Dans notre cas, une hydrolyse d'une durée inférieure à 36 h est insuffisante pour faire disparaître la totalité des stréopogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 respectivement mises en œuvre. Nous avons utilisé une hydrolyse de 36 h et une hydrolyse de 72 h.

Nous résumons ici les conclusions encore très incomplètes que cette opération permet de tirer quant aux séquences respectives de TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6.

Hydrolyse de 36h: Des 7 fractions (v. tableau 4 et fig. 2) obtenues à partir de l'hydrolyse ménagée chlorhydrique de 36 h de TB- γ 2/5, seules TB- γ 2/5-2, TB- γ 2/5-4

Tableau 4. *Fractions retirées des hydrolysats de 36 heures*

Stréopogénine dégradée	Fraction	Acides aminés	Nombre de restes
TB- γ 2/5	1	glu, tyr, ala, val, pro	non homogène
	2	glu, ala, val, pro	1, 1, 1, 1
	3	glu, tyr, ala, val, pro	contient surtout un tripeptide ala(1), glu(1), pro(1)
	4	glu, tyr, ala, val, pro	1, 1, 1, 1, 2
	5	glu, ala, val	non homogène
	6	glu, arg	1, 1
	7	arginine	
TB- γ 2/6	1	glu, leu, val, pro	1, 1, 1, 2
	2	glu, leu, val, pro	non homogène
	3	glu, leu, val, pro	1, 1, 1, 1
	4	glu, leu, val, pro, lys	non homogène
	5	glu, leu, val, pro, lys	non homogène
	6	glu, lys	1, 1
	7	lysine	

²¹⁾ Nous adoptons l'abréviation *glm* pour désigner le reste glutamine.

²²⁾ F. SANGER & E. C. P. THOMPSON, *Biochem. J.* **53**, 353 (1953).

²³⁾ D. F. ELLIOT & W. S. PEART, *Biochem. J.* **65**, 246 (1957).

et TB- γ 2/5-6 sont des peptides homogènes, la 7^{me} fraction étant un acide aminé déterminé.

TB- γ 2/5-2 est un tétrapeptide, et TB- γ 2/5-4, un hexapeptide, contenant respectivement 1 et 2 restes de proline. TB- γ 2/5-6 est un dipeptide hydrolysable en acide glutamique et arginine. Nous savons que l'arginine est C-terminale dans TB- γ 2/5. La séquence de ce dipeptide ne peut être alors que H. glu. arg. OH, mais il se comporte comme un produit basique et d'autre part, il est révélaible à la ninhydrine: l'acide glutamique qu'il contient doit être en réalité sous forme de reste glutamine: H. glm. arg. OH. Nous observons d'ailleurs souvent, après les hydrolyses partielles par l'acide chlorhydrique, que des peptides fournissant 1 mol. d'acide glutamique et

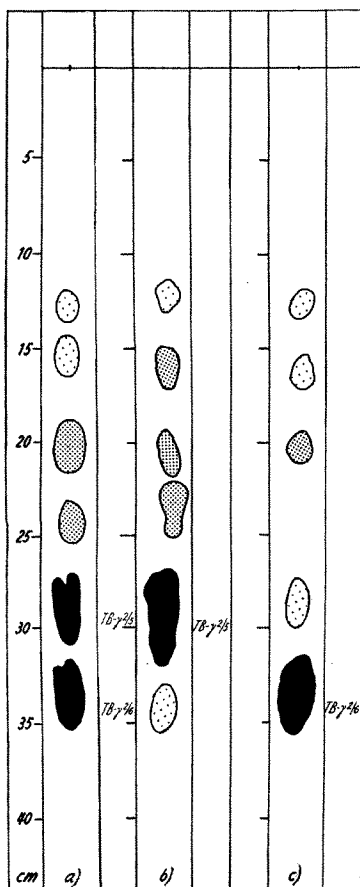


Fig. 1. Chromatographie de TB- γ 2, TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6.

- a) Chromatographie «Standard» de TB- γ 2.
- b) Chromatographie «WALEY-WATSON» de TB- γ 2/5 impure.
- c) Chromatographie «WALEY-WATSON» de TB- γ 2/6 impure.

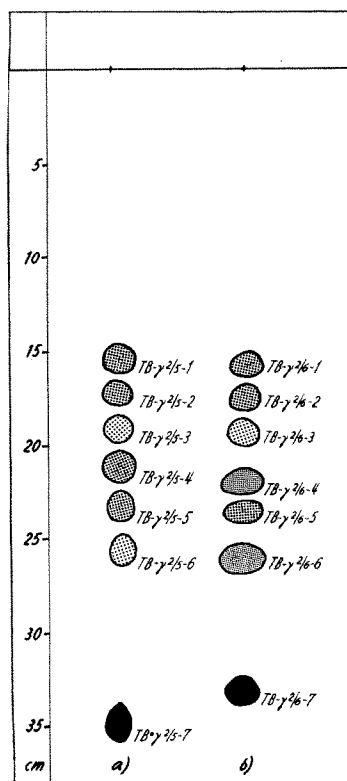


Fig. 2. Electrophorèse des hydrolysats chlorhydriques de 36 h, pH 2, 26 V/cm, 1 h 45.

- a) hydrolysate de TB- γ 2/5.
- b) hydrolysate de TB- γ 2/6.

une de lysine ou d'arginine migrent à l'électrophorèse comme des peptides basiques. Rappelons aussi que l'hydrolyse de la glutamine de la caséine par l'acide chlorhydrique concentré à 37° est encore incomplète après 72h¹⁾. Il n'est donc pas étonnant de rencontrer encore certains peptides pourvus de leur glutamine native, dans les hydrolysats de 36 h par l'acide chlorhydrique conc. à 37°.

L'hydrolyse chlorhydrique de 36 h de la *strépopgénine TB- γ 2/5* confirme donc la présence de la séquence . . . *glm. arg. OH* postulée déjà après action de la carboxypeptidase A.

L'hydrolyse partielle chlorhydrique de 36 h de la *strépopgénine TB- γ 2/6* confirme à son tour l'existence de la séquence . . . *glm. lys. OH* trouvée d'après le résultat de l'action de la carboxypeptidase A. Cette hydrolyse nous fournit encore les peptides TB- γ 2/6-1 et 3 contenant respectivement glu (1), leu (1), val (1), pro (2) et glu (1), leu (1), val (1), pro (1). Toutes les autres fractions sont impures.

Ces résultats montrent deux choses: 36h d'hydrolyse chlorhydrique à 37° ne suffisent pas pour faire apparaître des peptides assez courts; pour avoir un plus grand nombre de fractions pures, le fractionnement par électrophorèse à pH 2 à haut potentiel doit être précédé d'une séparation électrophorétique au pH 6,5 de l'ensemble des peptides en fractions respectivement acide, neutre et basique.

IV. Détermination de la séquence de TB- γ 2/6; données acquises: H. val (glm(1), val (2), pro (4), leu (1)) glm. lys. OH

Hydrolyse chlorhydrique de 72 h: L'électrophorèse à pH 6,5, à 26 V/cm, de l'hydrolysats montre la présence de 8 fractions désignées respectivement par: TB- γ 2/6-1' à 3' (acides); TB- γ 2/6-4' (neutre); TB- γ 2/6-5' à 8' (basiques) (fig. 3).

Examen des fractions acides. Nous avons d'abord déterminé et dosé les acides aminés formés par ces 3 fractions après leur hydrolyse intégrale. A cet effet, nous avons séparé les produits d'hydrolyse par une chromatographie selon PARTRIDGE²⁴⁾ suivie d'une électrophorèse à haut potentiel au pH 2⁴⁾; les acides aminés ont été

Tableau 5. *Peptides acides, issus de TB- γ 2/6 par hydrolyse chlorhydrique de 72 h*

Peptides TB- γ 2/6	Acides aminés présents (nombre de restes)	Ac. aminé N-terminal	Structure partielle
3'/1	val(2), glu(1), leu(1), pro(1)	val	H. val (val(1), glu(1), leu(1), pro(1)). OH
3'/3	val(1), glu(1), leu(1), pro(1)	glu	H. glu(val(1), leu(1), pro(1)). OH
2'/1	glu(1), val(1), leu(1)	glu	H. glu (val(1), leu(1)). OH
2'/2	val(2), glu(1), leu(1), pro(x)	val	H. val (glu(1), val(1), leu(1), pro(x)). OH

dosés par les méthodes déjà indiquées^{9) 10)}. Nous constatons que TB- γ 2/6-1' n'est pas modifié par l'hydrolyse intégrale: c'est de l'acide glutamique. Par contre, les autres fractions sont constituées par un mélange de nombreux polypeptides, comme le montre le fait qu'on ne trouve pas de rapports entiers entre les restes d'acides aminés mis en évidence. Purifiée par une nouvelle électrophorèse mais à pH 2, de 34 V/cm, TB- γ 2/6-2' est séparée en 2 nouvelles fractions, TB- γ 2/6-2'/1 et TB- γ 2/6-2'/2, alors que TB- γ 2/6-3' fournit 4 sous-fractions (voir fig. 4).

²⁴⁾ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* 42, 238 (1948).

D'après l'analyse quantitative, toutes ces fractions sont homogènes, sauf la fraction 3'/2. Cette conclusion est confirmée par le fait que sauf pour cette fraction, on ne trouve chaque fois qu'un seul acide aminé N-terminal (voir tableau 5).

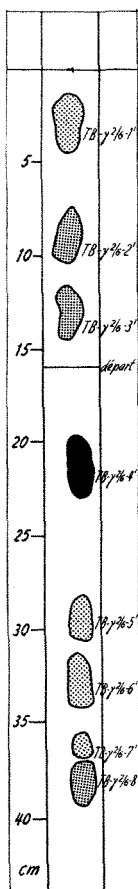


Fig. 3. Electrophorèse de l'hydrolysât chlorhydrique de 72 h de TB- γ 2/6, pH 6,5, 25 V/cm, 2 h.

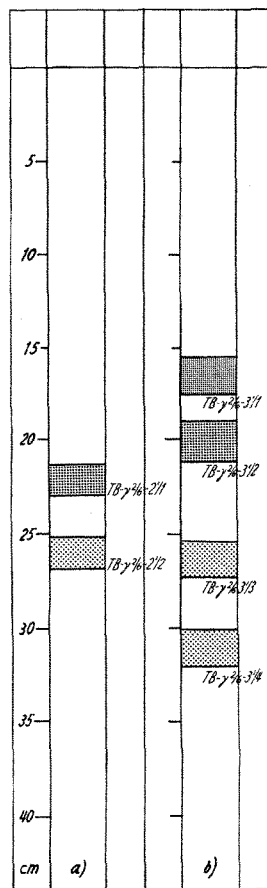


Fig. 4. Electrophorèse de fractions acides de l'hydrolysât chlorhydrique de 72 h, pH 2, 34 V/cm, 2 h.

a) TB- γ 2/6-2'. b) TB- γ 2/6-3'.

Examen de la fraction neutre, TB- γ 2/6-4'. A l'électrophorèse à pH 2, 26 V/cm, la fraction neutre fournit 7 bandes (TB- γ 2/6-4'/1 . . . 7), dont la 7^{me} est un peptide basique (fig. 5) d'après sa position dans le phérogramme. La présence de ce peptide dans le mélange des constituants neutres est paradoxale. Mais nous avons déjà observé des rétentions de peptides de mobilité plus élevée dans des peptides neutres de mobilité plus faible¹⁾, au cours d'électrophorèses à haut potentiel, au pH 6,5. – Une prise de chaque fraction est hydrolysée intégralement et les acides aminés qui en résultent, sont analysés qualitativement d'abord, par chromatographie bidimensionnelle selon ROCKLAND³⁾, effectuée sur 5 à 10 μ g de l'hydrolysât, puis quantitative-

ment⁹⁾¹⁰⁾ et lorsque la quantité de peptide l'autorise, son acide aminé N-terminal est déterminé selon¹³⁾.

Le tableau 6 indique les peptides isolés de la fraction neutre par l'électrophorèse mentionnée, leurs acides aminés, les proportions moléculaires trouvées, et les conclusions qui en découlent quant à la séquence.

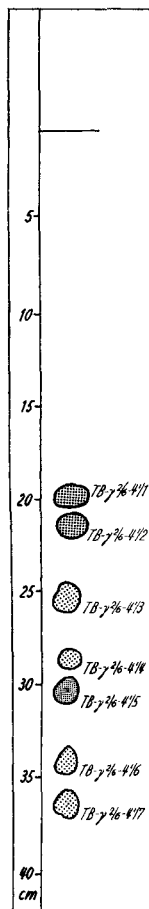


Fig. 5. Electrophorèse de la fraction neutre (TB- γ 2/6-4') de l'hydrolysat chlorhydrique de 72 h de TB- γ 2/6
pH 2, 26 V/cm, 2 h 30 .

Examen des fractions basiques TB- γ 2/6-5' à 8' (v. fig. 3). La fraction 7' semble identique à la fraction 4'/7: val (1), glu (1), leu (1), pro (x), lys (1). Quant à la fraction 8', elle constitue un térapeptide H. val (pro (1), glm (1)). lys. OH qui doit représenter l'extrémité C-terminale de la strépegénine TB- γ 2/6, puisqu'on y trouve la lysine C-terminale de cette dernière. Le reste glu trouvé après hydrolyse intégrale de ce térapeptide doit se trouver dans le peptide intact sous forme de glm, vu les propriétés basiques du peptide.

Déduction de la structure de TB- γ 2/6. Nous savons par l'hydrolyse chlorhydrique de 36 h que des deux résidus d'acide glutamique, l'un est lié à la lysine (acide aminé C-terminal de la strépegénine) dans la séquence ... glm. lys. OH. Nous apprenons

Tableau 6. *Peptides neutres issus de TB- γ 2/6 par hydrolyse chlorhydrique de 72 h*

Peptides TB- γ 2/6	Acides aminés présents (nombre de restes)	Ac. aminé N- terminal	Structure partielle
4'/1	leu(1), val(1), pro(x)	leu	H. leu (val(1), pro(x)).OH
4'/2	val(2), glu(1), leu(1), pro(2)	val	H. val (glu(1), val(1), leu(1), pro(2)).OH
4'/3	val(2), glu(1), leu(1), pro(3)	val	H. val (glu(1), val(1), leu(1), pro(3)).OH
4'/4	val(1), leu(1), pro(2),	val	H. val (leu(1), pro(2)).OH
4'/5	val(1), glu(1), pro(1),	val	H. val (glu(1), pro(1)).OH
4'/6	val(1), glu(1), pro(1), lys(1)	—	
4'/7	val(1), glu(1), leu(1), pro(x), lys(1)	—	

par le peptide TB- γ 2/6-2'/1: *H. glu. (leu, val). OH*, que le second reste glutamique est lié à un reste de valine ou de leucine.

Un des trois restes de valine est N-terminal de l'undécapptide constituant la strépopénine, le second est N-terminal du peptide basique TB- γ 2/6-8', *H. val.-(pro (1), glm (1)) lys. OH*. Le troisième reste de valine est présent dans un peptide contenant deux résidus de valine (TB- γ 2/6-3'/1), peptide qui contient encore un reste d'acide glutamique, un reste de leucine et un reste de proline, *H. val. (val (1), glu (1), leu (1), pro (1)) OH*; dans ce peptide, la valine N-terminale ne peut être que le résidu N-terminal de la strépopénine. La valine à l'intérieur de ce peptide ne peut être que le second résidu de valine, dont on doit fixer la place par rapport à l'acide glutamique et à la leucine. Or, il n'y a qu'un reste de leucine dans l'undécapptide; tous les fragments contenant de la leucine doivent donc provenir de la même région de la chaîne polypeptidique de cette strépopénine. En conséquence, TB- γ 2/6-2'/1: *H. glu. (val (1), leu (1)) OH* doit être un tripeptide engagé dans le pentapeptide *H. val. (glu (1), val (1), leu (1), pro (1)) OH* (TB- γ 2/6-3'/1); ce qui permet d'établir la séquence partielle *H. val. glu. (val (1), leu (1), pro (1))* ... pour la strépopénine.

Les peptides TB- γ 2/6-2'/2, 4'/2 et 4'/3 ne se distinguent entre eux que par le nombre de restes de proline qu'ils contiennent. Ils ont tous la même séquence N-terminale *H. val. glu. (leu (1), val (1))* ... Comme la strépopénine TB- γ 2/6 a pour extrémité N-terminale *H. val. glm* ... ils représentent donc tous un fragment plus ou moins long de cette extrémité. Comme ils ne se distinguent entre eux que par un nombre variable de restes de proline, ceux-ci doivent faire suite à la fin de la séquence indiquée plus haut, on peut donc écrire pour TB- γ 2/6 le début de séquence *H. val. glu. (leu (1), val (1)) pro. pro. pro...*

TB- γ 2/6-4'/1 nous indique que la leucine est N-terminale d'un peptide contenant plusieurs restes de proline et un reste de valine; mais celui-ci peut très bien être le troisième reste de valine, qui est engagé dans la partie C-terminale de la strépopénine ... *val. (pro (1), glm (1)) lys. OH*. Or TB- γ 2/6-4'/7 nous montre que la leucine fait partie d'un peptide leu (1), glu (1), val (1), pro (x), lys (1), qui ne contient qu'un reste de valine; or, celui-ci doit forcément faire partie de la séquence ... *val (pro, glm) lys. OH*; par conséquent la leucine doit être N-terminale (voir TB- γ 2/6-4'/1) d'un peptide *H. leu. pro. pro. pro. val. pro. glm. lys. OH*.

Ainsi, la seule structure complète que l'on puisse admettre pour la strépopénine TB- γ 2/6, après la confrontation de ces résultats (v. tableau 7), est *H. val. glm. val.-*

leu. pro. pro. pro. val. pro. glm. lys. OH dans laquelle les deux restes d'acide glutamique trouvés après hydrolyse sont représentés par des restes de glutamine, pour les raisons que nous avons exposées plus haut.

Tableau 7. *Peptides utilisés pour établir la séquence de TB- γ 2/6*

Hydrolyses	Peptides	Structures partielles
HCl 72 h	3'/1	H. val (glu, val, leu). OH
	2'/1	H. glu (val, leu). OH
	3'/3	H. glu (val, leu, pro). OH
	4'/2	H. val (glu, val, leu, pro, pro). OH
	4'/3	H. val (glu, val, leu, pro, pro, pro). OH
	4'/5	H. val (pro, glm). OH
	8'	H. val (pro, glm) lys. OH
HCl 36 h	4'/7	H. leu (pro, pro, pro, val, pro, glm) lys. OH
	6	. . . glm. lys. OH
Carboxypeptidase	TB- γ 2/6	. . . glm. lys. OH
Structure proposée		H. val. glm. val. leu. pro. pro. pro. val. pro. glm. lys. OH

Nous remarquons que seule la liaison valine-proline n'est pas scindée durant l'hydrolyse chlorhydrique de 72 h à 37° (figure 6).

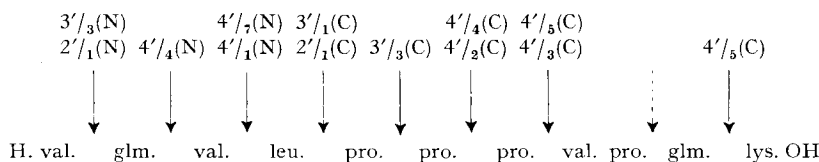


Fig. 6. Indications (\rightarrow) de la rupture des liaisons peptidiques de TB- γ 2/6, par hydrolyse à l'acide chlorhydrique conc., à 37°, 72 h.

Les peptides engendrés par cette dégradation sont indiqués selon notre nomenclature; leurs extrémités N et C terminales sont données respectivement par (N) et (C).

Dans la figure 6 sont indiquées les ruptures des liaisons peptidiques de la strépopégénine sous l'effet de l'hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique de 72 h, les peptides engendrés par ces ruptures étant énumérés. Nous devrions théoriquement recueillir 17 fragments peptidiques selon le découpage que nous présentons; en fait nous isolons 12 peptides de cet hydrolysate. Les peptides *H. pro. pro. pro. val. pro.-glm. lys. OH*, *H. pro. val. pro. glm. lys. OH*, *H. val. glu. val. OH*, et *H. leu. pro. pro.-pro. val. pro. OH* ainsi que la valine comme acide aminé isolé n'ont pas été identifiés. Une hydrolyse partielle des 1er, 2me et 4me de ces peptides, qui aboutirait à de la proline libre ou à des di- et tri-peptides proliniques, est peu vraisemblable car la réaction à l'isatine, caractéristique de la proline libre N-terminale, est négative sur tous les phérogrammes. Quant à la liaison prolyl-glutamine, elle doit être hydrolysée en fournissant un peptide H. glm. lys. OH (v. hydrolyse de 36 h) qui s'hydrolyse à son tour en ses constituants.

Hydrolyse par la subtilisine. Dans l'intention de réaliser une hydrolyse partielle de la strépopégénine TB- γ 2/6, par un autre agent que l'acide chlorhydrique, nous nous

sommes adressés à un enzyme, la subtilisine²⁵⁾ 26). On sait²⁷⁾ que cette protéinase de *Bacillus subtilis* est capable d'effectuer la scission d'une grande variété de liaisons peptidiques. Dans cette hydrolyse, la fonction amide de la glutamine est théoriquement respectée, mais en fait, au pH 8 de l'incubation, une partie de la glutamine

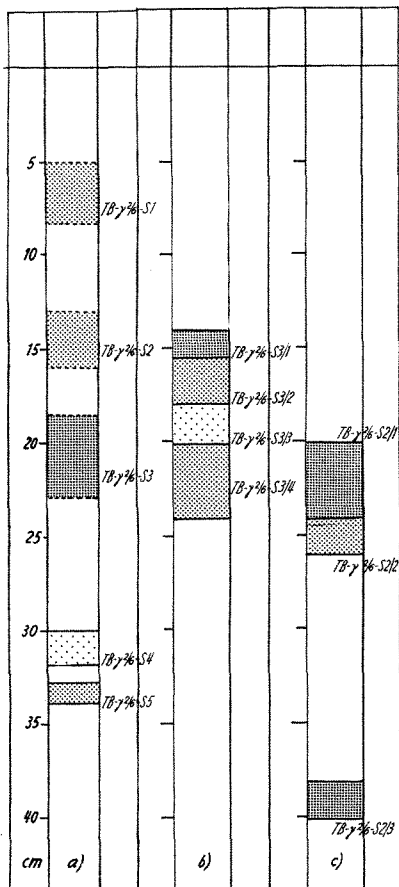


Fig. 7. Electrophorèses de l'hydrolysate «subtilisine» de TB- γ 2/6.

- a) Hydrolysate complet, pH 6,5, 26 V/cm, 2 h 40.
- b) Fraction 1 de cet hydrolysate (TB- γ 2/6-S1), pH 2, 26 V/cm, 2 h 30.
- c) Fraction 2 de ce hydrolysate (TB- γ 2/6-S2), pH 2, 26 V/cm, 2 h 30.

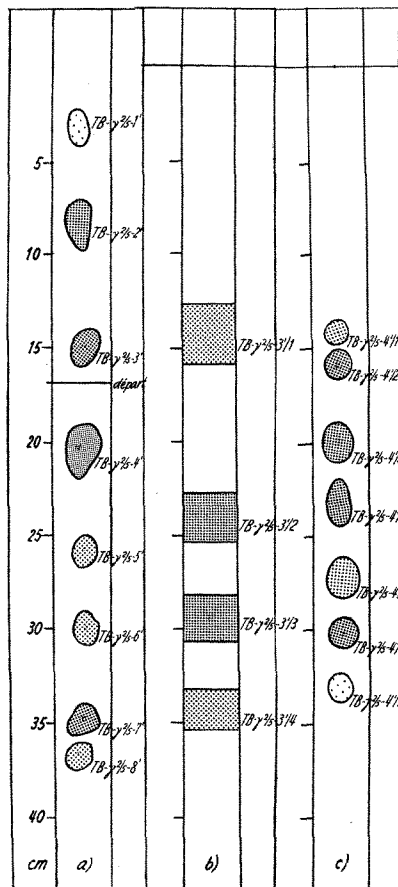


Fig. 8. Electrophorèses de l'hydrolysate chlorhydrique de 72 h de TB- γ 2/5 et de ses fractions.

- a) Hydrolysate complet, pH 6,5, 26 V/cm, 2 h.
- b) Fraction acide, TB- γ 2/5-3, de cet hydrolysate, pH 2, 34 V/cm, 2 h.
- c) Fraction neutre, TB- γ 2/5-4, de cet hydrolysate, pH 2, 26 V/cm, 2 h 30.

²⁵⁾ A. V. GÜNTEMBERG & M. OTTESEN, *Nature* 170, 802 (1952).

²⁶⁾ Nous renouvelons nos remerciements au Dr M. OTTESEN, du Laboratoire Carlsberg, à Copenhague, qui a bien voulu nous remettre cet enzyme.

²⁷⁾ E. S. HAUGAARD & N. HAUGAARD, *C. r. Trav. Lab. Carlsberg, sér. chim.* 29, 350 (1955); B. MEEDOM, *ibid.* 29, 403 (1955).

libre ou N-terminale de peptides se cyclise en acide pyrrolidonecarboxylique ou en pyrrolidonylpeptide, qui échappent à la détection par la ninhydrine.

L'hydrolyse de TB- γ 2/6 par la subtilisine conduit à un mélange dans lequel on trouve 5 fractions, après électrophorèse à pH 6,5, 26 V/cm, 2 h 40, et électrophorèse à pH 2, 26 V/cm des deux premières des fractions de la première opération (fig. 7; dans la figure lire dans la bande b) ... S 1/1, etc. au lieu de ... S 3/1, etc.).

L'analyse de ces peptides après leur séparation par l'électrophorèse, n'apporte pas beaucoup de renseignements utiles pour l'établissement de la structure de TB- γ 2/6. Cela tient avant tout au fait que la récupération des peptides à partir du phérogramme s'est révélée mauvaise, si bien que les quantités dont on pouvait disposer pour l'analyse étaient souvent trop faibles. Néanmoins, nous rencontrons dans cet hydrolysate un peptide basique (TB- γ 2/6-S2/1) qui contient glm (1), pro (x), val (1), lys (1) et un peptide neutre (TB- γ 2/6-S1/1), glm (1), pro (x), leu (1), val (1). Ces peptides correspondent respectivement aux peptides déjà rencontrés *H. val. pro. glm. lys. OH* (TB- γ 2/6-8') et *H. glu. val. leu. pro (x) OH* (TB- γ 2/6-4'/3).

L'activité strépegénique de cet hydrolysate reste considérable. Cela doit provenir d'une part de la présence de strépegénine TB- γ 2/6 non encore dégradée et d'autre part de la présence de polypeptides peu dégradés (et encore actifs), comme l'indique l'examen par chromato-électrophorèse de l'hydrolysate total. Notons à ce sujet que l'hydrolyse par la subtilisine d'une autre strépegénine, non décrite ici (TB- β 2/1) et qui est exempte de proline, aboutit à un hydrolysate qui n'a plus aucune activité strépegénique.

V. Détermination de la séquence de la strépegénine TB- γ 2/5; données acquises:

H. ala. (ala (1), glm (1), pro (4), tyr (1), val (1)), val. glm. arg. OH

Hydrolyse chlorhydrique de 72 h. L'hydrolyse chlorhydrique incomplète, par l'acide chlorhydrique concentré à 37° durant 72 h, scinde le dodécapeptide TB- γ 2/5 en de nombreux peptides. Par une première électrophorèse à 26 V/cm à pH 6,5, on sépare les composants acides, neutres et basiques (voir fig. 8). Les composants acides et neutres respectivement sont fractionnés par une seconde électrophorèse à pH 2 à respectivement 34 et 26 V/cm (fig. 8). Toutes ces opérations conduisent à identifier 11 fractions dont plusieurs sont homogènes comme le montre la détermination des restes d'acides aminés qu'ils contiennent et la présence d'un acide aminé N-terminal unique. Les analyses de ces peptides sont reportées dans le tableau 8.

Nous savons par l'hydrolyse à la carboxypeptidase et l'hydrolyse chlorhydrique partielle de 36 h, que l'un des deux restes d'acide glutamique (glutamine) de la molécule est lié à l'arginine, acide aminé C-terminal de cette strépegénine. Nous confirmons ce résultat en isolant après cette hydrolyse chlorhydrique de 72 h le peptide basique (TB- γ 2/5-6) *H. glm. arg. OH*. Notons que celui-ci doit être sous forme de glutaminyl-arginine, sinon il ne serait pas un peptide basique. On sait par ailleurs (p. 1800) que la valine précède la glutamine et l'arginine, dans la séquence ... *val. glm. arg. OH*. Nous apprenons par le peptide TB- γ 2/5-3'/4 que le second reste d'acide glutamique est lié à un reste d'alanine dans la séquence ... *ala. glu. ...* Les peptides TB- γ 2/5-3'/3 et 4'/3, *H. ala. (glu (1), pro (1)). OH* et *H. ala. (glm (1), pro (1)). OH* contiennent la séquence *H. ala. glu. ...* mentionnée plus haut, et puisque ces peptides

ne contiennent pas de valine, nous sommes en droit d'écrire la séquence H. ala. glu. pro..., c'est-à-dire, pour la molécule primitive *H. ala. glm. pro...*

Le second reste d'alanine de TB- γ 2/5 est N-terminal d'un peptide (4'/1), *H. ala.-(val (1), pro (2))*. OH qui se retrouve complété par un reste d'acide glutamique chez 4'/2, *H. ala. (val (1), pro (2), glu (1))*. OH. De ces deux restes d'alanine, quel est celui qui est N-terminal de cette strépogénine ? Aucun des peptides isolés de cet hydrolysate ne peut nous l'apprendre.

Tableau 8. *Peptides issus de TB- γ 2/5 par hydrolyse chlorhydrique de 72 h*

Peptides TB- γ 2/5	Acides aminés présents (nombre de restes)	Ac. aminés N-terminal	Structure partielle
3'/1	val(1), glu(1), ala(1), pro(1)		
3'/2	glu, ala, pro		
3'/3	ala(1), glu(1), pro(1)	ala	H. ala (glu(1), pro(1)). OH
3'/4	ala(1), glu(1)	ala	H. ala. glu. OH
4'/1	ala(1), val(1), pro(2)	ala	H. ala (val(1), pro(2)). OH
4'/2	ala(1), glu(1), val(1), pro(2)	ala	H. ala (glu(1), val(1), pro(2)). OH
4'/3	ala(1), glu(1), pro(1)	ala	H. ala (glm ^a)(1), pro(1)). OH
6	glu(1), arg(1)	glu	H. glm ^b arg. OH
8	arginine		arginine

a) Le peptide étant neutre, l'ac. glutamique (glu) doit être présent comme glutamine (glm).

b) Le peptide étant basique, l'ac. glutamique (glu) doit être présent comme glutamine (glm).

Comme dans le cas de la strépogénine TB- γ 2/6 où nous nous sommes servis de la leucine pour établir des parentés entre certains peptides de façon à compléter les séquences partielles déjà trouvées, nous nous servirons pour TB- γ 2/5 de la tyrosine pour parvenir au même but. Mais la tyrosine, comme on le sait (voir page 1797), est détruite dans sa plus grande partie lors de l'hydrolyse chlorhydrique intégrale des peptides élués du papier. Pour l'identifier, il est donc nécessaire de la déterminer sur chaque peptide par la méthode à l' α -nitroso- β -naphthol¹²⁾.

Hydrolyse de TB- γ 2/5 par la chymotrypsine. Nous avons alors remplacé l'hydrolyse partielle par l'acide chlorhydrique concentré, par l'hydrolyse chymotrypsique, qui doit scinder la strépogénine native à la fonction amide carboxylique du reste tyrosine pourvu qu'il ne soit pas engagé avec un résidu de proline, dans la séquence ... tyr. pro .. Or, après l'action de la chymotrypsine, nous constatons une scission; par conséquent, le reste de tyrosine n'est pas associé à un reste de proline, comme ... tyr. pro...

Par électrophorèse à pH 6,5, 26 V/cm, nous séparons l'hydrolysate en 2 fractions principales, l'une neutre, l'autre basique, et en une fraction secondaire, basique, présente en petite quantité (fig. 9). Ce dernier produit, dont nous ne pouvons pas expliquer la formation, analysé selon le procédé habituel, fournit de l'acide glutamique et de la proline.

Des 2 fractions principales, la fraction neutre contient de la tyrosine comme le faisait prévoir la spécificité d'action de la chymotrypsine. Cette fraction semble être

homogène: elle n'est pas modifiée par une électrophorèse à pH 2 à 33 V/cm. La tyrosine doit être C-terminale, on constate que l'alanine est N-terminale; on y trouve en outre pro (2), val (1), glu (1). On peut donc attribuer à ce peptide la séquence approchée suivante H. ala. (glm (1), pro (2), val (1)) tyr. OH. Mais, au moyen de l'hydrolyse partielle chlorhydrique de 72 h, nous avons pu établir la séquence N-terminale suivante H. ala. glm. pro . . . On peut donc préciser la séquence donnée plus haut en écrivant: *H. ala. glm. pro. (pro (1), val (1)) tyr. OH.*

Si la tyrosine était précédée d'un reste de valine, la carboxypeptidase A libérerait de ce peptide un reste de tyrosine. Mais son incubation par l'enzyme ne libère aucun acide aminé, le peptide n'est pas modifié. Tout se passe donc comme si la séquence des deux acides aminés valine et proline engagés avant la tyrosine était val. pro., par conséquent un reste de proline doit précéder la tyrosine; en effet, les liaisons peptidiques engageant de la proline comme reste prolyle sont hydrolysées lentement par la carboxypeptidase. (Voir action de l'enzyme sur les liaisons pro. glm. et pro.-val., p. 1799).

Nous sommes donc autorisés à décrire la séquence N-terminale de la strépopéginine TB- γ 2/5 par *H. ala. glm. pro. val. pro. tyr. . .*

Quant à la fraction basique principale, les analyses montrent que l'alanine est N-terminale, qu'elle contient 2 restes de proline, 1 reste de valine, 1 reste d'acide glutamique et 1 reste d'arginine. On peut donc décrire sa séquence approchée par *H. ala. (pro (2), val (1), glm (1)) arg. OH*, ce qui représente l'extrémité C-terminale de la strépopéginine. Or, nous savons par l'action de la carboxypeptidase que les trois premiers acides aminés C-terminaux sont . . . val. glm. arg. OH. Il s'ensuit que dans ce peptide basique, les 2 restes de proline sont voisins et nous pouvons écrire la séquence C-terminale suivante: . . . *ala. pro. pro. val. glm. arg. OH.*

Rappelons que les 2 restes d'acide glutamique de cette strépopéginine doivent être sous forme de restes glutamine, puisque 2 équivalents d'ammoniac sont libérés après hydrolyse adéquate, que le carboxyle de l'arginine (C-terminale) est libre et que le polypeptide est de caractère basique. En conséquence, nous proposons pour la strépopéginine TB- γ 2/5 la séquence complète suivante: *H. ala. glm. pro. val. pro. tyr.-ala. pro. pro. val. glm. arg. OH* (voir tableau 9).

Tableau 9. Peptides utilisés pour établir la séquence de TB- γ 2/5

Hydrolyses	Peptides	Structures partielles
HCl 12N, 72 h	3'/3	H. ala. (glu, pro). OH
	4'/3	H. ala. (glm, pro). OH
	3'/4	H. ala. glu. OH
	4'/2	H. ala. (glu, pro, pro, val). OH
	4'/1	H. ala (pro(2), val). OH
carboxypeptidase chymotrypsine	6	H. glm. arg. OH
	sur TB- γ 2/5	H. (pro). val. glm. arg. OH
carboxypeptidase	TB- γ 2/5-CH1	H. ala (glm, pro, pro, val) tyr. OH
	TB- γ 2/5-CH2	H. ala. (pro(2), val, glm). arg. OH
	sur TB- γ 2/5-Chl	H. ala. (glm, pro, val) pro. tyr. OH
structure proposée		H.ala.glm.pro.val.pro.tyr.ala.pro.pro.val.glm.arg.OH

Hydrolyse de TB- γ 2/5 par la subtilisine. Cet enzyme hydrolyse cette strépopgénine à pH 8 en 15 h, à 25°, en de nombreux fragments.

Au moyen d'une électrophorèse à pH 6,5 sous 26 V/cm (fig. 10), on décèle une fraction neutre et cinq fractions basiques. Par électrophorèse à 26 V/cm, à pH 2, la fraction neutre TB- γ 2/5-S1 se sépare en quatre sous-fractions, et la fraction faiblement basique (TB- γ 2/5-S2), en deux sous-fractions TB- γ 2/5-S2/1 et S2/2 (fig. 10). On obtient donc en tout 10 fractions.

La chromatographie de cet hydrolysats selon PARTRIDGE²⁴) suivie d'une électrophorèse⁴) à pH 2 sous 30 V/cm conduit aussi à 10 fractions. On y décèle la strépo-

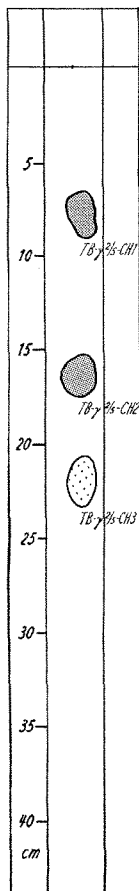


Fig. 9. *Electrophorèse de l'hydrolysats chymotrypique de TB- γ 2/5*

pH 6,5, 26 V/cm, 3 h.

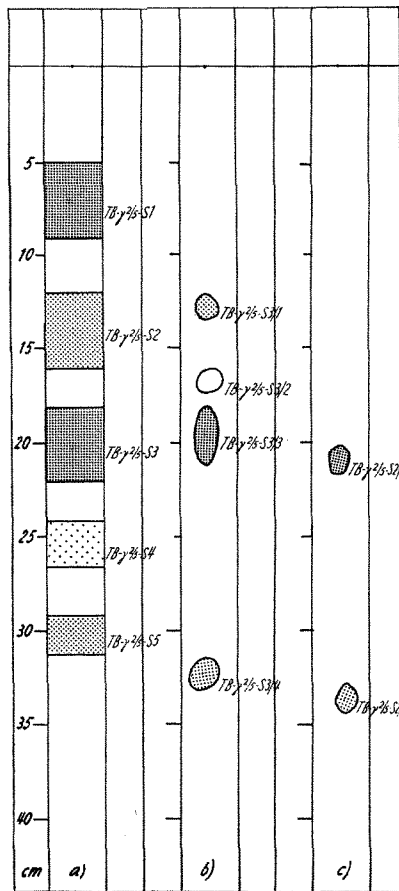


Fig. 10. *Electrophorèses de l'hydrolysats «subtilisine» de TB- γ 2/5.*

a) Hydrolysats complet, pH 6,5, 26 V/cm, 2 h 40.

b) Fraction 1 de cet hydrolysats (TB- γ 2/5-S1), pH 2, 26 V/cm, 2 h 30.

c) Fraction 2 de cet hydrolysats (TB- γ 2/5-S2), pH 2, 26 V/cm, 2 h 30.

Tableau 10. Fractions retirées de l'hydrolysat subtilisine de TB- γ 2/5

Peptides	Acides aminés (nombre de restes indiqué entre parenthèses)
S1/2 (neutre)	ala(1), glu(1), pro(x)
S1/3 (neutre)	ala(1), glu(1)
S1/4 (neutre)	glm
S2/1 (basique)	strépogénine native
S5 (basique)	H. glm. arg. OH

génine non hydrolysée et un peptide peu dégradé de mobilités électrophorétique et chromatographique voisines de celle de la strépogénine primitive. Un dipeptide *H. val. glm. OH* est également identifié. L'hydrolyse à la subtilisine ne permet pas d'avoir une vue d'ensemble de la structure du dodécapeptide parce que le rendement en matériel peptidique isolé du papier là aussi n'est pas bon. Toutefois, les peptides analysés sont en accord avec la structure déjà proposée pour cette strépogénine. L'activité strépogénique de cet hydrolysat est encore grande. Cela peut s'expliquer en partie par la présence de strépogénine native et en partie par l'existence de fragments encore actifs (gros peptides) d'une part, d'autre part la présence de glutamine. On sait que la glutamine²⁸⁾ accélère aussi la croissance de *Lactobacillus casei*, mais cette substance, au-delà d'une concentration de 2 μ g par ml²⁹⁾ n'exerce plus d'effet stimulateur.

Stabilité relative de TB- γ 2/5 vis-à-vis du Lactobacillus casei ATCC 7469. La strépogénine est hydrolysée très lentement par le lactobacille, dans un tampon isotonique au sérum sanguin, de pH 7 à 38°. L'autolyse du lactobacille lui-même ne fait apparaître que des traces d'acides aminés et de matériel peptidique, tandis que tous les acides aminés de TB- γ 2/5 sont visibles dès la 18^{me} heure. Cependant, il reste une quantité notable de strépogénine native dans l'incubat jusqu'à la fin de l'hydrolyse que nous avons poursuivie pendant 78 heures.

VI. Quelques considérations générales. – Les strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 sont caractérisées par une forte teneur en proline. L'arrangement entre eux des restes de proline dans chacun de ces polypeptides est assez remarquable: séquence ... pro. pro. pro ... chez TB- γ 2/6 et ... pro. pro ... chez TB- γ 2/5, à côté de pro isolé. Ces détails de structure doivent conférer aux deux strépogénines des formes spatiales désordonnées. Selon SZENT GYORGYI³⁰⁾, 8% de proline distribuée statistiquement dans la chaîne peptidique contribuent à donner au polypeptide une structure spatiale du type polyproline.

La rupture de la molécule de TB- γ 2/5 en deux hexapeptides par la chymotrypsine laisse subsister 20% de l'activité dans chacun des fragments, H. ala. glm. pro. val. pro. tyr. OH et H. ala. pro. pro. val. glm. arg. OH, ceux-ci ayant la même activité.

Si on essaie de trouver des éléments communs aux séquences de TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6, on ne trouve que peu de données: il y a dans chacun 4 restes de proline,

²⁸⁾ D. W. WOOLLEY, J. biol. Chemistry 172, 71 (1948).

²⁹⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, non publié.

³⁰⁾ A. G. SZENT GYORGYI & C. COHEN, Science 126, 697 (1957).

mais distribués différemment, et deux restes de glutamine, situés chaque fois dans des positions pénultièmes des deux extrémités.

Aucun élément de structure des deux strépogénines ne se retrouve dans les strépogénines retirées de l'insuline par WOOLLEY³¹⁾ ou synthétisées par lui³²⁾. TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 sont également entièrement différentes d'une autre strépogénine TB- β 2/1 que nous avons aussi isolée³³⁾ de l'hydrolysate de caséine. Ceci confirme l'idée que l'activité strépogénique n'est pas liée à des éléments de structure très spécifiques.

Partie expérimentale

I. Méthodes de fractionnement et de purification

1. *Electrophorèses à haut potentiel.* Elles sont effectuées soit avec un type d'appareil permettant d'utiliser deux feuilles de papier de 15 \times 58 cm ou une feuille de papier de 15 \times 82 cm, soit avec un appareil capable d'effectuer six électrophorèses simultanées sur des papiers de 58 cm de long. Dans le premier cas, on peut appliquer, pour les feuilles de 58 cm de long une tension de 34,5 V/cm au maximum, et pour les feuilles de 82 cm de long, de 24,4 V/cm. Dans le second cas, on applique une tension maximum de 34,5 V/cm.

Ces deux types d'appareils seront décrits ultérieurement.

Nous utilisons des tampons de force ionique faible, pour assurer la constance du courant électrique dans le support, et de grande volatilité, pour éviter la présence de sels dans les fractions lyophilisées. Voici la composition des tampons à pH 6,5 et à pH 2: pour pH 2: ac. acétique, ac. formique et eau (en vol. 30/23/94,7); pour pH 6,5: pyridine, ac. acétique et eau (en vol. 10/0,4/89,6). Dans chacun des phérogrammes, on réserve une ou plusieurs bandes-témoins qui, après électrophorèse, sont découpées et révélées par les réactifs appropriés (voir II, 2), ce qui nous permet de repérer sur le reste du phérogramme l'emplacement des fractions polypeptidiques à récupérer du papier support. Il faut absolument éviter que les papiers à phérogrammes ne deviennent secs avant l'élution car nous avons constaté que lorsque le papier devient sec, il retient de manière irréversible du matériel peptidique.

2. *Elution.* Les bandes découpées dans le phérogramme et contenant les fractions intéressantes, sont placées dans des appareils élueurs qui individuellement effectuent simultanément l'élution quantitative de ces fractions. Nous décrivons cet élueur dans un prochain mémoire. Tous les peptides rencontrés dans ce travail sont très solubles dans l'eau, aussi toutes les éluions se feront-elles avec de l'eau distillée. L'éluat se trouve en entier dans un volume de 0,4 à 0,8 ml. Dès réception, cette solution est congelée puis lyophilisée. Malgré les lavages multiples préalables des papiers supports d'électrophorèse, un peu de matériel hydrosoluble étranger accompagne toujours les peptides élués. Il s'agit essentiellement de dérivés glucidiques exempts d'azote, mais qui sont responsables de la destruction d'une grande partie de la tyrosine (voir p. 1797) au moment de l'hydrolyse intégrale des peptides par l'acide chlorhydrique 5,7 N à 105°.

3. *Chromatographies sur papier.* Les chromatographies sont faites par voie descendante dans des cuves de verre étanches dont l'atmosphère est saturée par les solvants utilisés. Les cuves de verre sont placées dans une armoire thermostatée à 24° \pm 2°.

Sur les papiers de chromatographie, on réserve des bandes destinées à repérer les fractions peptidiques par les réactifs appropriés.

Les solvants acides et alcooliques sont préparés une semaine avant leur emploi et sont considérés comme périmés 3 semaines après le jour de leur confection.

Solvants utilisés:

pour les peptides: 1. «standard», butanol sec., ac. acétique, eau: 67/16/25 (vol.).

2. «WALEY-WATSON»³⁴⁾ butanol-n, pyridine, ac. acétique, eau: 30/20/6/24 (vol.).

pour les ac. am.: 3. «LEVY»²⁾, voir 5); b) *m*-crésol, phénol: 1 M/1 M dans tampon borate, pH 9,3 (200 ml B(OH)₃ 0,1 M + 113,5 ml NaOH 0,1 N).

³¹⁾ R. B. MERRIFIELD & D. W. WOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 78, 358 (1956).

³²⁾ R. B. MERRIFIELD & D. W. WOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 80, 6635 (1958).

³³⁾ P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, à publier.

³⁴⁾ S. G. WALEY & J. WATSON, Biochem. J. 55, 328 (1953).

4. «ROCKLAND»³), a) butanol-tert., ac. formique, eau: 69,5/10/29,5 (vol.);
b) 94 ml phénol redistillé et 10 ml ammoniacque conc.
5. «PARTRIDGE» butanol-n, ac. acétique, eau: 40/10/50, (vol.).

pour les ac. dinitrophényl aminés:

6. «KOCH & WEIDEL»⁹), a) Po_4HNa_2 , $\text{Po}_4\text{H}_2\text{Na}$: 0,5 M 1 M; pH 6; b) butanol-n, NH_3 0,3%: 1:1 (vol.).

Les qualités des papiers de chromatographie dont il est fait usage sont indiquées lors de la description de chacune des opérations.

4. *Applications à l'isolement des strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6.* – a) *Electrophorèse à pH 2 de la fraction TB- γ .* Sur une feuille de papier WHATMAN N° 3, on dépose 15 mg de la fraction TB- γ en une ligne¹). Après 1 h 30 d'électrophorèse, la bande de 2 cm de large réservée à la révélation est découpée et après réaction à la ninhydrine 0,4%, la fraction TB- γ 2 y est repérée. Après élution, on obtient cette fraction par lyophilisation. Le rendement de cette opération est donné dans le tableau 1. Cette fraction contient les strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 que l'on sépare l'une de l'autre par chromatographie sur papier.

b) *Chromatographie de la fraction TB- γ 2 avec le solvant «standard».* Sur un papier SCHLEICHER & SCHUELL 2043A lavé, on dépose 500 μ g de la fraction TB- γ 2 en une tache de 7 mm de diamètre et répète ce dépôt sur une ligne de 52 cm, en faisant en sorte que les taches soient tangentes les unes aux autres. Trois bandes témoins de 2 cm de large sont délimitées respectivement sur les bords et au centre de la feuille de chromatographie. Le bas de cette feuille est découpé en fines pointes de façon à permettre au solvant de s'écouler aisément lorsqu'il y parviendra.

La chromatographie s'effectue alors par voie descendante avec le solvant «standard» dans le sens d'orientation des fibres de cellulose. La durée de cette opération est de 20 h. On procède à 3 ou 4 chromatographies identiques simultanées, de façon à fractionner en une seule fois env. 160 mg de TB- γ 2.

Après avoir séché les chromatogrammes à 35°, on révèle les 3 bandes témoins par le réactif à la ninhydrine 0,4%, ce qui permet de situer l'emplacement des fractions contenant resp. TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 (voir figure 1). Les zones de papier qui les contiennent sont découpées et éluées comme mentionné dans I, 2. Après lyophilisation des éluats, on détermine leur teneur en azote total par ultramicrodosage selon BAUDET & CHERBULIEZ⁸).

Après ces opérations, la quantité de ces strépogénines retirée de la fraction TB- γ 2 représente respectivement le 5,4% pour TB- γ 2,5, et le 2/4% pour TB- γ 2/6 de cet tefraction. Nous avons pu déterminer par micro-KJEDAHN leurs teneurs en azote qui sont resp. de 17% et 16,5%.

c) *Chromatographie avec le solvant «WALEY-WATSON».* Le matériel élué des chromatogrammes précédents, qui représente le 50% du matériel initial mis en œuvre, est fractionné une seconde fois par une chromatographie effectuée dans les mêmes conditions que la précédente mais cette fois-ci avec le solvant «WALEY-WATSON» (voir I, 3, 2). Après une durée de chromatographie de 15 h, les papiers sont séchés à 35°, et les 3 bandes-témoins, révélées par le réactif à la ninhydrine 0,4%. Les zones du papier contenant les strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 sont alors découpées et éluées comme indiqué plus haut. Les strépogénines ainsi obtenues après lyophilisation des éluats sont pures; cependant comme le montre l'analyse qualitative et quantitative des acides aminés, il peut arriver que TB- γ 2/5 contienne encore une petite quantité de TB- γ 2/6. Une nouvelle chromatographie «standard» (selon b) de ce matériel non encore homogène permet alors d'obtenir une strépogénine pure.

5. *Chromatographies bidimensionnelles des strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6.* 1^{er} système: 1^{re} direction «ROCKLAND» a; 2^e direction «ROCKLAND» b. – 2^e système: 1^{re} direction «PARTRIDGE»; 2^e direction «WALEY-WATSON». Solvants: voir I, 3.

II. Méthodes analytiques

1. *Dosage bactériologique des strépogénines:* voir ¹).

2. *Réactifs pour colorimétrie.*

a) *Réactions qualitatives:*

Ninhydrine *puriss.* 0,4 %: 1 g de ninhydrine, 222 ml butanol sec.,
25 ml H₂O, 2,5 ml ac. acétique.

Ninhydrine *puriss.* 0,025%: 25 mg de ninhydrine dans 100 ml d'acétone.

Isatine¹⁸), SAKAGUCHI¹⁷), FOLIN & MARENZI⁶).

b) *Réactions quantitatives:*

Solution de ninhydrine *puriss.*³⁵⁾ 8).

CHINARD¹¹⁾.

α -Nitroso- β -naphthol¹²⁾.

3. *Hydrolyses intégrales.* – a) *Hydrolyse chlorhydrique.* 100 μ g de peptide sont dissous dans 10 μ l d'ac. chlorhydrique 5,6N. Par capillarité, cette solution est introduite dans un capillaire ouvert en pyrex, de 0,6 mm de diamètre interne et de 12 cm de long. Ensuite, le capillaire est fermé au bout opposé au côté de l'introduction. La solution est alors poussée vers l'extrémité fermée, par une brève centrifugation de façon qu'on puisse fermer l'autre extrémité sans risquer la décomposition d'une partie du peptide dissous. Pour l'hydrolyse, le capillaire scellé est chauffé 18 h à $105^\circ \pm 2^\circ$. Ensuite, l'hydrolysate est poussé à l'une des extrémités du capillaire par une centrifugation. Le capillaire est alors ouvert en son milieu et, par une nouvelle centrifugation, l'hydrolysate est transféré du fragment du capillaire où il se trouve, dans un godet en verre de 10 mm \times 10 mm, où il sera évaporé à sec. Le résidu est repris 2 fois par 50 μ l d'eau distillée, et la solution, chaque fois évaporée à sec sous vide. C'est le résidu final qui est utilisé.

b) *Hydrolyse barytique.* Dans 20 μ l de Ba(OH)₂ 0,38N, on dissout 200 μ g de peptide. La solution est portée dans un capillaire identique à celui qui a été décrit précédemment, à l'aide de manipulations tout à fait semblables. L'hydrolyse est faite durant 15 h à 150° . L'hydrolysate est ensuite neutralisé par 20 μ l d'acide sulfurique 1,9N. Le précipité de sulfate de baryum est éliminé par centrifugation, et lavé; et la solution plus les eaux de lavage sont amenées à sec; le résidu est utilisé.

4. *Détermination de l'ammoniac.* L'hydrolyse des amides primaires des peptides est effectuée selon LEVY³⁾: la solution d'env. 100 μ g de peptide dans 20 μ l d'ac. chlorhydrique 2N est introduite dans un capillaire (pyrex) de 0,6 mm de diamètre intérieur et de 15 cm de long. Le capillaire scellé est plongé 2 h dans un bain-marie bouillant. Pour l'appréciation semi-quantitative de l'ammoniac de l'hydrolysate, on l'alcalinise par MgO et laisse l'ammoniac diffuser 24 h dans de l'ac. sulfurique 0,1M, le tout étant placé dans une enceinte étanche. Après ce laps de temps, le godet renfermant l'ac. sulfurique est plongé dans 2 ml du réactif à la ninhydrine (voir II, 2b).

Pour le dosage de l'ammoniac dans l'hydrolysate, on alcalinise la solution et entraîne l'ammoniac par un courant d'air purifié, dans de l'ac. sulfurique 0,01M. On introduit alors dans le tube récepteur le réactif à la ninhydrine (voir II, 2b) et dose l'ammoniac comme décrit⁸⁾. Pour ce dosage, nous avons développé un appareillage qui sera décrit dans un prochain mémoire.

5. *Dosages des acides aminés.* – a) *Dosage avec la ninhydrine.* Le dosage des acides aminés, à l'exception de la proline, est effectué par une méthode semblable à celle que décrit WUNDERLY¹⁰⁾. Après la chromatographie de l'hydrolysate dans une première direction avec le solvant «PARTRIDGE» (voir I, 3,5) la séparation des ac. aminés est poursuivie par une électrophorèse à pH 2 à 30 V/cm dans la seconde direction. Nous utilisons toujours du papier SCHLEICHER & SCHUELL 2043A lavé, de façon à prévenir des réactions parasites avec la ninhydrine lors de la révélation des acides aminés. Le papier du chromato-électrophorogramme est trempé dans une solution acétonique de ninhydrine 0,025% contenue dans une cuve de polyéthylène, puis introduit dans une étuve à 80° durant 7 min. Il est passé ensuite dans de l'hydroxyde de potassium alcoolique 0,1M contenu dans une autre cuve de polyéthylène. Le papier est séché 30 min à 40° . Les taches correspondant aux acides aminés sont repérées et découpées, puis introduites dans des tubes de pyrex de 18 \times 180 mm (lavés par de l'hydroxyde de sodium 0,01N) contenant 2 ml du réactif de MOORE & STEIN³⁵⁾, modifié⁸⁾. Le dosage est alors conduit selon nos indications antérieures⁸⁾. Dans le chromato-électrophorogramme on découpe 4 blancs qui serviront à établir la valeur colorimétrique moyenne due aux impuretés du papier, réagissant à la ninhydrine. Notons qu'il est nécessaire d'éliminer le plus rapidement possible le tampon d'électrophorèse à pH 2 pour éviter la fixation d'ammoniac sur le papier, et que toute source d'ammoniac doit être absente de la salle où l'on effectue ce dosage. Nous remarquons qu'après les électrophorèses les blancs dus au papier sont notablement plus bas que les blancs du même papier après la chromatographie. Il s'agit sans doute d'une purification que subit le papier au cours de l'électrophorèse.

Pour le dosage, nous utilisons un volume final de 7 ml, sauf lorsque la quantité des acides aminés est très faible; dans ce cas, nous utilisons un volume final de 2,5 ml en effectuant les

³⁵⁾ S. MOORE & W. STEIN, J. biol. Chemistry 211, 907 (1954).

mesures colorimétriques avec une cuve appropriée à ce volume. Dans le premier cas, nous dosons de 0,05 à 0,5 μ mole d'acides aminés. La précision de cette méthode varie de 5 à 8% de la valeur absolue selon les présentes.

b) *Dosage avec les dérivés dinitrophenylés.* Le mélange des acides dinitrophenyl-aminés préparés selon KOCH & WEIDEL⁹⁾ est déposé sur le papier de chromatographie SCHLEICHER & SCHUELL 2043b et séparé par la méthode bidimensionnelle de ces auteurs⁹⁾. Autant que possible on travaille à l'abri de la lumière. On découpe les taches jaunes correspondant aux acides DNP-aminés et les introduit débitées en bandelettes étroites dans 6 ml d'éthanol, pour leur élution. Si cette élution ne peut être faite immédiatement, les papiers avec les acides DNP-aminés sont conservés jusqu'au moment de l'élution, dans un dessiccateur aux parois complètement noircies. Les densités optiques des éluats alcooliques sont déterminées sous 1 cm d'épaisseur à 360 $m\mu$, et à 385 $m\mu$ pour la DNP-proline.

La quantité moléculaire des acides DNP-aminés est calculée à partir des densités optiques et d'un coefficient d'extinction moléculaire commun, moyen de 15600.

c) *Dosage de la proline.* Nous effectuons ce dosage au moyen du réactif de CHINARD¹¹⁾, après chromato-électrophorèse (voir II, 5a). Nous décrirons dans un autre mémoire la méthode détaillée de cette détermination.

d) *Dosage de la tyrosine.* Nous l'avons réalisé avec 50 à 100 μ g de substance selon¹²⁾. Nous dressons simultanément une courbe d'étalonnage à l'aide de 1, 5, 10, 30 et 60 μ g de tyrosine. Ces lectures sont faites dans l'électrophotomètre KLETT-SUMMERSON, avec le filtre bleu.

6. *Identification de l'isoleucine, de la cystine et du tryptophane.* — a) *Isoleucine.* On effectue une électrophorèse à pH 2, à 30 V/cm de 200 μ g de l'hydrolysate (provenant de l'hydrolyse chlorhydrique intégrale, voir II, 3a) des stréptogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6. On repère alors la zone où se localisent la valine, la leucine et l'isoleucine, au moyen d'un témoin de 0,2 μ mole de leucine. Cette zone est éluee; l'éluat est amené à sec et le résidu est repris par 20 μ l d'eau distillée. Cette solution est déposée sur un papier WHATMAN N° 1 pour subir la chromatographie selon WORK⁷⁾, qui sépare ces 3 acides aminés les uns des autres. Cette opération ne fournit dans notre cas de taches qu'aux niveaux des témoins de leucine et de valine. Les stréptogénines ne contiennent donc pas d'isoleucine.

b) *Cystine.* 200 μ g de stréptogénine sont dissous dans 20 μ l d'ac. formique pur. Cette solution est refroidie à -8° . On y ajoute 200 μ l d'une solution d'ac. performique refroidie à -10° , obtenue

Tableau 11. *Dosage des acides aminés d'env. 0,1 μ mole de peptide*
(quantité calculée d'après l'azote introduit)

Procédé	TB- γ 2/5, 0,11 μ mole				TB- γ 2/6, 0,11 μ mole			
	ac. aminés	dens. opt.	mole	restes	ac. aminés	dens. opt.	mole	restes
dinitrophenyl. (BECKMAN DU)	ala	0,600	0,220	2,00	leu	0,320	0,100	0,99
	glu	0,650	0,230	1,09	glu	0,640	0,220	2,00
	val	0,620	0,226	2,05	val	0,980	0,350	3,10
	arg	0,290	0,106	0,96	lys	0,320	0,110	1,00
	pro	1,250	0,457	4,16	pro	1,140	0,420	3,96
	NH ₃	—	0,370	2,05	NH ₃	—	0,395	1,80
	TB- γ 2/5, 0,180 μ mole				TB- γ 2/6, 0,230 μ mole			
ninhydrine (KLETT)	ala		0,360	2,0	leu		0,200	0,90
	glu		0,360	2,0	glu		0,460	2,0
	val		0,400	2,2	val		0,640	2,8
	arg		0,180	1,0	lys		0,220	0,95
	pro		0,720	4,0	pro		0,920	4,0
α -nitroso- β - naphthol (KLETT)	tyr		0,165	0,91				

en mélangeant 0,25 ml d'eau oxygénée à 1,5% et 4,75 ml d'ac. formique pur, à la température ordinaire. Dans ce mélange, la cystine éventuellement présente dans le peptide est entièrement oxydée en acide cystéique en 5 h. L'acide performique et l'ac. formique utilisé comme solvant sont alors éliminés à 25° dans un évaporateur rotatif³⁶). Le résidu est repris par de l'eau distillée et l'évaporation est répétée. Le résidu qui en résulte est encore traité au vide 24 h dans un dessiccateur à KOH. Le peptide est repris par de l'eau, cette solution est concentrée à sec dans un godet en verre de 10 mm × 10 mm. Le résidu final est dissous dans 20 μ l d'ac. chlorhydrique 5,6N et l'hydrolyse intégrale est faite comme indiqué (II, 3a).

L'hydrolysate est fractionné en ses acides aminés par chromatographie électrophorèse (voir II, 5a). L'acide cystéique, s'il est présent, ne migre pratiquement pas au cours de la chromatographie et migre au niveau de l'ac. glutamique au cours de l'électrophorèse.

On ne trouve pas d'acide cystéique dans les hydrolysates chlorhydriques intégraux des stropogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 oxydés. Ces stropogénines ne contiennent donc pas de cystine.

c) *Tryptophane*. Après l'hydrolyse barytique des stropogénines (voir II, 3b), l'hydrolysate débarrassé de Ba²⁺ est concentré puis soumis à la chromatographie bidimensionnelle de LEVY²). Le tryptophane (qui n'est pas décomposé par cette hydrolyse et n'est pas adsorbé sur le précipité de SO₄Ba) est absent de l'hydrolysate des stropogénines. Notons que la valine et la leucine sont fortement adsorbées sur SO₄Ba, puisqu'elles sont à peine visibles sur le chromatogramme.

7. Résultats obtenus avec les stropogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6: v. tableau 11.

III. Détermination des structures

1. *Mise en évidence de l'acide aminé N-terminal*. Cette détermination est faite selon la technique de SANGER¹³). 50–200 μ g des stropogénines ou des peptides résultant de leur hydrolyse partielle sont dissous dans 0,1 ml de triméthylamine à 1%, et cette solution est portée dans 0,2 ml d'éthanol contenant 10 μ l de dinitrofluorobenzène *puriss.*

Le tube de réaction est placé 3 h dans un bain thermostaté à 30° ± 0,1°. L'excès de réactif est extrait à l'éther, la solution aqueuse est amenée à sec dans un godet de verre de 10 mm × 10 mm et le dinitrophénol formé est éliminé dans sa plus grande partie par sublimation. A cet effet, le résidu de la dinitrophénylation est introduit dans une éprouvette à vide dans laquelle plonge un tube fermé en bas et fixé au bouchon qui ferme l'éprouvette. Le tube est rempli de glace sèche. Sous un vide de 0,02 Torr, le dinitrophénol sublime à la température ordinaire et se dépose sur la paroi froide du tube intérieur. En 60 min la presque totalité du dinitrophénol est éliminée. La petite quantité qui en reste est visible sur le chromatogramme bidimensionnel effectué selon KOCH & WEIDEL⁹). Avec les quantités mises en œuvre, la densité optique d'une solution alcoolique de cette tache de dinitrophénol donne à 360 m μ une densité optique voisine de 0,400, ce qui représente environ 0,15 μ mole ou 30 μ g de dinitrophénol. – Il est avantageux d'éliminer au mieux le dinitrophénol avant l'hydrolyse chlorhydrique intégrale, car sa présence se traduit par une certaine destruction de tous les acides aminés présents.

L'acide DNP-aminé N-terminal est extrait de l'hydrolysate chlorhydrique intégral par de l'éther. Il est examiné en chromatographie bidimensionnelle selon KOCH & WEIDEL⁹). La position du dinitrophénol sert d'indicateur à la position relative de l'acide DNP-aminé N-terminal. Le dérivé DNP de l'acide aminé N-terminal peut être dosé par spectrophotométrie à 360 m μ . On observe alors un rendement à peu près quantitatif pour l'alanine N-terminale chez TB- γ 2/5 et un rendement d'env. 66% pour la valine N-terminale chez TB- γ 2/6, après ces opérations.

On observe toujours sur le chromatogramme de la dinitraniline; celle-ci est une mesure directe de la décomposition de l'acide DNP-aminé N-terminal.

La phase aqueuse contient les acides aminés privés de la totalité ou d'une partie de l'acide aminé N-terminal. Ils peuvent être identifiés après chromatographie électrophorèse (voir II, 5a), et dosés par la ninhydrine (voir II, 5a) ou dinitrophénylés à leur tour et dosés selon KOCH & WEIDEL (voir II, 5b).

2. *Mise en évidence de l'acide aminé C-terminal*. – a) *Par hydrazinolyse*. Selon AKABORI¹⁴), l'hydrazinolyse des liaisons peptidiques aboutit à la formation des hydrazides de tous les acides aminés sauf l'acide aminé C-terminal, libéré tel quel. Il est séparé des hydrazides, par extraction

³⁶) L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

de ces derniers sous forme de benzalhydrazones par la benzaldéhyde. On identifie l'acide aminé C-terminal par une chromatographie bidimensionnelle selon LEVY³⁷). — Seule la strépogénine TB- γ 2/5 a pu être analysée avec succès par cette méthode.

Pour cette opération, un capillaire en pyrex contenant une solution de 200 μ l d'hydrate d'hydrazine dans laquelle sont dissous 360 μ g de strépogénine TB- γ 2/5 ou TB- γ 2/6 est scellé et placé 6 h dans un bain-marie bouillant. Après cette période de réaction l'excès d'hydrazine est évaporé sous vide dans un dessiccateur à acide sulfurique. Le résidu est repris par 2 ml d'eau. Pour former les benzalhydrazones des hydrazides aminés, on ajoute à la solution précédente 0,2 ml de benzaldéhyde et agite le mélange durant 2 h à l'aide d'un vibro-mischer. L'excès de l'aldéhyde et les hydrazones formées sont éliminés par extraction à l'éther. La phase aqueuse contient l'acide aminé C-terminal, identifié par chromatographie bidimensionnelle³⁷).

Cette réaction fournit de l'arginine à partir de TB- γ 2/5. Dans le cas de TB- γ 2/6, aucun acide aminé libre n'a pu être décélé (destruction de la lysine C-terminale au cours de l'hydrazinolyse?).

b) *Par la carboxypeptidase.* — (1) *Dosage de la carboxypeptidase par spectrophotométrie UV.* Cette opération est basée sur le dosage spectrophotométrique de la tyrosine dont la carboxypeptidase A contient 10%. Une prise de 0,1 ml de la suspension aqueuse de carboxypeptidase (A) recristallisée, WORTHINGTON lot CO 564, est centrifugée à 2500 t/min à 4° durant 20 min, puis lavée 3 fois par de l'eau bidistillée. On reprend ensuite le culot de centrifugation par 3 ml de NaOH 0,1 N. Les densités optiques de cette solution alcaline sont déterminées à 280 m μ (0,590), à 294 m μ (0,550), à 340 m μ (0,039) et à 360 m μ (0,027). On calcule la teneur en restes de tyrosine à l'aide des équations de GOODWIN & MORTON³⁷). La préparation utilisée par nous contenait 636 μ g d'enzyme dans 0,1 ml de suspension aqueuse. Le dosage gravimétrique donne une valeur très voisine.

(2) *Détermination de l'acide aminé C-terminal.* Respectivement 750 μ g des strépogénines TB- γ 2/5, TB- γ 2/6 et 300 μ g de la fraction provenant de l'hydrolyse chymotrypsique de TB- γ 2/5 (TB- γ 2/5-CH1) sont dissous dans 0,5 ml de tampon pH 8 (carbonate d'ammonium 1 M, acétate d'ammonium 0,05 M) contenant 30 μ l de la suspension aqueuse de carboxypeptidase (191 μ g) lavée comme indiqué plus haut. Le rapport enzyme-substrat exprimé en rapport moléculaire est de 0,018/0,154, soit 1/83. L'incubation à 37° \pm 0,5° dure 10 h pour les strépogénines et 43 h pour TB- γ 2/5-CH1. On arrête l'action enzymatique en abaissant le pH à env. 3 par l'addition de quelques gouttes d'ac. formique concentré. Pour l'analyse de l'hydrolysate, on effectue une électrophorèse à pH 6,5, à 27 V/cm, sur une prise de 50 μ l, en ce qui concerne les strépogénines, et une électrophorèse à pH 2 à 30 V/cm, sur la totalité de l'hydrolysate, en ce qui concerne TB- γ 2/5-CH1. Sur les mêmes papiers d'électrophorèse sont déposés, dans le cas des strépogénines, des témoins de 0,3 μ mole de lysine et d'arginine, et dans le cas de TB- γ 2/5-CH1 des témoins de 0,2 μ mole de tyrosine, valine et proline.

On met ainsi en évidence, l'arginine comme acide aminé C-terminal de TB- γ 2/5, et la lysine comme acide aminé C-terminal de la strépogénine TB- γ 2/6. L'hydrolysate par la carboxypeptidase de TB- γ 2/5-CH1 ne fournit aucun acide aminé.

3. *Hydrolyses partielles.* — a) *Hydrolyse chlorhydrique.* Pour les analyses d'orientation, 1 mg de chacune des strépogénines dissous dans 100 μ l d'ac. chlorhydrique 12 N, *pro analysi*, est hydrolysé à 37° dans un capillaire en pyrex de 2 mm de diamètre interne et de 15 mm de longueur, durant 6, 8, 12, 36 et 72 h. Les hydrolysats sont ensuite amenés à sec. Le résidu est repris par 0,2 ml d'eau et cette solution est à nouveau évaporée à sec. L'hydrolysate est alors fractionné par électrophorèse (voir I, 1).

Pour les analyses de structure, nous nous sommes arrêtés aux hydrolyses de 36 et de 72 h et avons utilisé 6 mg des strépogénines TB- γ 2/5 et TB- γ 2/6 avec les quantités correspondantes d'acide.

Examen des hydrolysats: L'hydrolysate de 36 h est fractionné par une électrophorèse de 1 h 45 à pH 2, à 30 V/cm sur papier SCHLEICHER & SCHUELL 2043a lavé. Comme témoin, la 10^e partie de l'hydrolysate est séparée sur le même papier de façon à permettre la localisation des fractions peptidiques par développement à la ninhydrine, en vue de l'éluion. Quant à l'hydrolysate issu de l'hydrolyse de 72 h, on le fractionne d'abord par électrophorèse de 1 h 45 à pH 6,5, à 26 V/cm, sur papier SCHLEICHER & SCHUELL 2043a lavé, en réservant une place pour le dépôt

³⁷) T. W. GOODWIN & R. A. MORTON, *Biochem. J.* 40, 628 (1946).

du témoin (1/10 de l'hydrolysate), puis les fractions neutres et acides obtenues après cette opération sont purifiées par une électrophorèse de 2 h à pH 2, respectivement à 26 V/cm et 34 V/cm sur le même papier.

b) *Hydrolyse par la carboxypeptidase A*. 1,4 mg de TB- γ 2/5 est dissous dans 1 ml de tampon pH 8 à l'acétate d'ammonium et carbonate d'ammonium 0,05M. On introduit dans cette solution 400 μ g de carboxypeptidase, lavés par l'eau distillée comme indiqué dans III, 2b, et dosés en suspension aqueuse par spectrophotométrie. L'incubation est faite à $38^\circ \pm 0,01^\circ$, en présence de microgouttes de toluène afin de prévenir une dégradation bactérienne. Des prises de 1/10 du volume de l'hydrolysate sont prélevées à la 7^e, 12^e, 28^e, 36^e, 42^e et 72^e heure d'incubation. Immédiatement après les prélèvements l'enzyme est désactivé dans la prise par introduction d'acide formique (\rightarrow pH 3) et la solution est évaporée à sec sous un vide ordinaire. Le résidu est soumis alors à un vide plus poussé (0,05 Torr) de façon à éliminer la plus grande partie de l'acétate et du formiate d'ammonium par sublimation, puis il est repris par 20 μ l de tampon d'électrophorèse de pH 6,5. La mise en évidence des acides aminés acides et basiques libres qu'il peut contenir (ac. glutamique, lysine et arginine) est réalisée par électrophorèse sous 33 V/cm, en 1 h 30, sur papier SCHLEICHER & SCHUELL 2043a lavé. Les acides aminés neutres libres du résidu (glutamine et valine) sont identifiés par électrophorèse à pH 2 à 30 V/cm, en 2 h.

Tableau 12. Exemples de dosages d'acides aminés dans des peptides

Peptide	Ac.aminés	μ Mole	Restes ^{a)}	Observations
TB- γ 2/6-4'/2	Glu	0,045	1,0	privé de la valine N-terminale ^{b)} (rdt en DNP-valine non quantitatif)
	Val	0,060	1,3	
	Pro	0,093	2,0	
	Leu	0,050	1,1	
TB- γ 2/6-4'/3	Glu	0,035	1,0	privé de la valine N-terminale ^{b)} (rdt en DNP-valine non quantitatif)
	Val	0,046	1,3	
	Leu	0,033	1,0	
	Pro	0,115	3,2	
TB- γ 2/5-4'/1	Val	0,080	1,0	privé de l'alanine N-terminale ^{b)}
	Pro	0,160	2,0	
TB- γ 2/5-4'/2	Val	0,060	0,92	privé de l'alanine N-terminale ^{b)}
	Glu	0,065	1,0	
	Pro	0,135	2,1	
TB- γ 2/5-4'/3	Glu	0,066	1,0	privé de l'alanine N-terminale ^{b)}
	Pro	0,065	1,0	
TB- γ 2/5-CH2	Glu	0,075	1,1	
	Ala	0,072	1,1	
	Val	0,065	1,0	
	Pro	0,130	2,0	
	Lys	0,063	1,0	
^{a)} chiffres les plus probables ^{b)} par dinitrophénylation du peptide, hydrolyse chlorhydrique intégrale et extraction de l'hydrolysate acide par l'éther, l'hydrolysate acide servant au dosage des acides aminés				

c) *Hydrolyse par la subtilisine*. 5,53 mg de TB- γ 2/5 et 5,28 mg de TB- γ 2/6 sont dissous dans 8 ml de tampon de pH 8 à l'acétate et carbonate d'ammonium 0,05M, contenant 420 μ g de subtilisine cristallisée.

Après 15 h 30 d'incubation à $27^\circ \pm 0,1^\circ$, on acidifie l'hydrolysate jusqu'à pH 4 par l'acide formique, l'amène à sec et élimine l'acétate et le formiate d'ammonium comme indiqué plus haut.

On fractionne la totalité des hydrolysats par électrophorèse à pH 6,5, à 26 V/cm, en 2 h 40 (voir fig. 7 et 10). Les fractions TB- γ 2/6-S1 (neutre) et TB- γ 2/6-S2, S3, S4, S5 (basiques) sont éluées, puis testées quant à leur pureté, en vue de leur analyse de structure. TB- γ 2/6-S1 (neutre) et TB- γ 2/6-S2 (légèrement basique) sont fractionnés encore en S 1/1, S 1/2, S 1/3, S 1/4 et S 2/1, S 2/2, S 2/3, par électrophorèse à pH 2, à 26 V/cm, en 2 h 30 (voir fig. 7)

Les fractions TB- γ 2/5-S1 (neutre) et TB- γ 2/5-S2 (légèrement basique) sont également fractionnées par électrophorèse à pH 2, dans les mêmes conditions; elles donnent respectivement S 1/1, S 1/2, S 1/3, S 1/4 et S 2/1, S 2/2, S 2/3. Les fractions TB- γ 2/5-S3 et S4 et S5 sont basiques.

d) *Hydrolyse par la chymotrypsine.* 1,7 mg de TB- γ 2/5 sont dissous dans 0,9 ml du tampon acétate-carbonate d'ammonium 0,05 M, de pH 8, contenant 100 μ g de chymotrypsine cristallisée WORTHINGTON, lot CD 576 - 8 I. Après 26 h d'incubation, l'hydrolysate acidifié par HCOOH, débarrassé comme plus haut de l'acétate et du formiate d'ammonium, est fractionné par électrophorèse à pH 6,5, 26 V/cm, durant 3 h, en TB- γ 2/5-CH1 (neutre) et TB- γ 2/5-CH2 (basique).

4. *Quelques exemples de dosages (à la ninhydrine) des ac. aminés de peptides issus des hydrolyses partielles, voir tableau 12.*

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE qui a permis la réalisation d'une partie importante de ce travail, ainsi que la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE à Bâle, dont l'aide a permis de l'achever.

SUMMARY

Two basic streptogenins have been isolated from a tryptic hydrolysate of casein, and their structures have been established.

We propose for the one (TB- γ 2/5) the sequence H. Ala. Glm. Pro. Val. Pro. Tyr. Ala. Pro. Pro. Val. Glm. Arg. OH and for the other (TB- γ 2/6) the sequence H. Val. Glm. Val. Leu. Pro. Pro. Pro. Val. Pro. Glm. Lys. OH.

Laboratoire de chimie organique et
pharmaceutique de l'Université de Genève

221. Zur biochemischen Kennzeichnung der Phosphomonoesterasen im Schwanzgewebe der *Xenopus*-Larve

von H. P. von Hahn, B. Niehus und R. Weber

(22. VIII. 60)

I. Einleitung. – Während die Phosphomonoesterasen im Säugetiergewebe bereits ausführlich bearbeitet worden sind (siehe z. B. ROCHE¹), ist über die genaueren kinetischen und biochemischen Eigenschaften dieser Enzymgruppe im Gewebe der Amphibien noch wenig bekannt. Dies gilt besonders für das Schwanzgewebe der Amphibienlarve, welches als Modell für die Untersuchung der Biochemie der Morphogenese viel Verwendung findet. Im Verlaufe unserer Arbeiten über das Verhalten der Phosphomonoesterasen im Schwanz der *Xenopus*-Larve²)³)⁴) erschien

¹) J. ROCHE, in «The Enzymes», ed. J. B. SUMNER & K. MYRBÄCK, Acad. Press Inc., Publ. New York 1950, 473.

²) R. WEBER, J. WEBER & B. NIEHUS, *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, im Druck.

³) R. WEBER & B. NIEHUS, *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, im Druck.

⁴) B. NIEHUS & H. P. V. HAHN, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 18, C33, 1960; H. P. V. HAHN, *ibid.* 18, C80, 1960.