

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES DINITROPHÉNYLAMINOACIDES

GÉRARD BISERTE, JAMES W. HOLLEMAN, JANINE HOLLEMAN-DEHOVE
ET PIERRE SAUTIÈRE*

*Laboratoire de Chimie Biologique** de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lille (France)*

SOMMAIRE

A. Introduction	225
B. Préparation des dinitrophénylaminoacides	226
a. Procédés généraux de synthèse	226
b. Cas particuliers de synthèse	228
C. Dinitrophénylation d'un hydrolysats de protéine	232
a. Hydrolyse de la protéine	232
b. Condensation avec le fluorodinitrobenzène; extraction des dérivés dinitrophénylés	232
c. Sublimation du dinitrophénol	235
D. Dinitrophénylation d'une protéine	236
a. Technique de condensation avec le fluorodinitrobenzène	236
b. Détermination de la quantité de protéine dans la DNP-protéine	238
c. Hydrolyse de la DNP-protéine	238
d. Extraction des dinitrophénylaminoacides	240
E. Dinitrophénylation d'un peptide	242
F. Chromatographie sur papier des dérivés dinitrophénylés éthersolubles	243
a. Solvants "toluène" et "phosphate"	243
b. Solvants " <i>n</i> -butanol-NH ₃ " et "phosphate"	246
c. Solvants " <i>sec.</i> -butanol-phtalate pH 6" et "phosphate"	247
d. Solvants "alcool <i>tert.</i> -amylique-phtalate pH 6" et "phosphate 1.5 M"	247
e. Valeurs comparées des différentes techniques	248
f. Autres systèmes solvants	248
G. Modalités d'application particulières de la chromatographie des DNP-aminoacides éthersolubles	251
a. Hydrolysats totaux d'une DNP-protéine et DNP-aminoacides d'un hydrolysats total	251
b. Hydrolysats enzymatiques de protéines; séparation des DNP-asparagine et DNP-glutamine	254
c. Milieux biologiques complexes	255
H. Chromatographie des DNP-aminoacides hydrosolubles	256
a. DNP-aminoacides hydrosolubles d'un hydrolysats total de protéine	256
b. DNP-aminoacides hydrosolubles d'un hydrolysats de DNP-protéine ou de DNP-peptide	257
I. Chromatographie des DNP-peptides	263
J. Chromatographie quantitative des DNP-aminoacides	264
a. Dosage des acides aminés d'un hydrolysats	265
b. Dosage d'un DNP-aminoacide en position N-terminale	269

A. INTRODUCTION

Les dinitrophénylaminoacides (DNP-aminoacides) sont des dérivés fréquemment employés dans la chimie des protéines. En effet, le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) se fixe facilement à la température du laboratoire et en milieu légèrement alcalin sur les groupes α -aminés libres d'un acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine.

* Avec la collaboration technique de Mlle M. T. PICQUÉ

** Directeur du Laboratoire: Prof. P. BOULANGER.

Au cours de cette condensation, le radical dinitrophényle peut également se fixer sur les groupements thiol de la cystéine et phénol de la tyrosine, les groupes ω -aminés des acides diamminés, ainsi que sur le noyau imidazole de l'histidine. L'arginine, les amides des acides dicarboxyliques donnent un dérivé monodinitrophénylé sur leur groupe α -aminé.

De très nombreux dinitrophénylaminoacides (DNP-aminoacides) sont *éthérosolubles*. Cependant quelques uns, comme l' α -mono-DNP-arginine, l'acide DNP-cystéique, l' α -DNP-histidine, l' ε -mono-DNP-lysine, l'O-DNP-tyrosine, la S-DNP-cystéine, l'imidazole-DNP-histidine, sont *hydrosolubles*.

La détermination de l'acide aminé porteur d'un groupe α -aminé libre et en position terminale dans une chaîne peptidique s'effectue très souvent par la méthode des dinitrophénylaminoacides de SANGER.

D'autre part, les acides aminés d'un hydrolysats total ou d'un hydrolysats enzymatique (action de la carboxypeptidase ou de la leucine-aminopeptidase) de protéine peuvent être identifiés et dosés sous la forme de leurs dérivés dinitrophénylés.

L'identification et le dosage des DNP-aminoacides constituent donc des problèmes analytiques primordiaux. Les méthodes de séparation sont principalement chromatographiques.

De nombreuses techniques de chromatographie sur colonnes ont été décrites: chromatographie sur gel de silice (SANGER⁷⁶, PORTER ET SANGER⁶⁷); sur gel de silice tamponné (BLACKBURN¹², MIDDLEBROOK⁵⁷); sur Kieselguhr (MILLS⁵⁸, BRAUNITZER ET REUTHER¹⁶); sur Hyflo-Super-Cel tamponné (BELL *et al.*⁷); sur acide silicique, Celite (GREEN ET KAY³¹). Mais il est beaucoup plus commode de se servir de la chromatographie de partage sur papier. D'assez nombreux systèmes solvants de valeur inégale ont été proposés. Actuellement, les séparations sont facilement obtenues à l'aide de plusieurs types de chromatographie bidimensionnelle dont nous décrirons plus loin les modalités. Des méthodes de chromatographie en phase inversée ont également été publiées: sur caoutchouc chloré (PARTRIDGE ET SWAIN⁶³), sur papier acétylé (BURTON¹⁸).

B. PRÉPARATION DES DINITROPHÉNYLAMINOACIDES

Les préparations des DNP-aminoacides de référence ont été décrites dans les articles de SANGER⁷⁶, PORTER ET SANGER⁶⁷, LEVY ET CHUNG⁴⁵, FRAENKEL-CONRAT, HARRIS ET LEVY²⁸, et RAO ET SOBER⁶⁹.

La préparation et les caractéristiques physiques de très nombreux DNP-aminoacides éthérosolubles sont rassemblés dans les articles de RAO ET SOBER⁶⁹ et de FRAENKEL-CONRAT, HARRIS ET LEVY²⁸.

a. Procédés généraux de synthèse

Deux procédés commodes de synthèse sont à retenir.

I. Procédé de LEVY ET CHUNG⁴⁵

La condensation se fait en milieu aqueux et à 40°. L'acide aminé (10 mmoles) et le carbonate de sodium anhydre (2 g) sont dissous dans 40 ml d'eau à 40°. Le fluoro-

dinitrobenzène (10 mmoles) est ajouté et le mélange est agité vigoureusement, la température étant maintenue à 40°. Les gouttelettes de fluorodinitrobenzène en suspension disparaissent au bout d'une demi-heure environ, ce qui marque la fin de la réaction. L'acidification (acide chlorhydrique concentré 3 ml) de la solution orange permet la précipitation du DNP-aminoacide, dont la cristallisation est amorcée par frottement. La recristallisation du DNP-aminoacide se fait à partir de mélanges solvants spéciaux (voir Tableau I).

TABLEAU I
SOLVANTS POUR LA PURIFICATION ET LA CRISTALLISATION* DES DNP-AMINOACIDES
(D'après RAO ET SOBER⁶⁰)

Éther-éther de pétrole (E: 30-70°)	L-Alanine, acide DL- et L- α -aminobutyrique, DL- et L-valine, acide DL- et L-glutamique, L-norvaline, L-isovaline, DL- et L-leucine, DL-, D- et L-alloisoleucine, DL- et L-thréonine, DL- et L-allothréonine, DL-méthionine, DL-éthionine, L-cystine, S-benzyl-L-cystéine, L-phénylalanine, DL- et L-proline, hydroxy-L-proline, acide DL-pipécolique
Méthanol aqueux	Glycocolle, DL- et L-sérine, L-asparagine, L-glutamine
Acétone aqueuse	Acide γ -hydroxy-L- α -aminobutyrique, acide ϵ -hydroxy-L- α -aminocaproïque, acide L- α , γ -diaminobutyrique, L-arginine, di-DNP-histidine
Acétone-éther	O,N-Di-DNP-L-tyrosine, L-tryptophanne, di-DNP-L-lysine
Acétone-éther de pétrole	Di-DNP-L-ornithine
Éthanol aqueux	β -Alanine

* En général, les DNP-DL-aminoacides cristallisent plus facilement que les dérivés correspondant de la série L, notamment pour l'acide glutamique, la méthionine, la leucine et la tyrosine.

Les dérivés bis-dinitrophénylés (cystine, tyrosine, lysine, histidine) exigent un nombre de millimoles de fluorodinitrobenzène double de celui de l'acide aminé. La quantité de carbonate de sodium est portée à 4 g dans le cas de la cystine et de la lysine et à 3 g dans le cas de la tyrosine, de l'histidine, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique.

2. Procédé de RAO ET SOBER⁶⁰

La réaction de condensation est réalisée en agitant l'acide aminé avec le fluorodinitrobenzène en présence d'un léger excès de bicarbonate de sodium pendant 2 à 5 h dans l'éthanol à 50% et à la température du laboratoire (il est recommandé d'effectuer les condensations ainsi que tous les stades de la préparation à l'obscurité). L'alcool est éliminé à la température du laboratoire et l'excès de fluorodinitrobenzène extrait par agitation trois fois avec de l'éther. La solution aqueuse est acidifiée jusqu'à réaction nettement acide par de l'acide chlorhydrique 6 N. Le précipité ou l'huile qui se sépare est lavé plusieurs fois avec de petites quantités d'eau glacée.

(i) *Cas des DNP-aminoacides précipités sous forme d'huile.* Procédé valable pour les acides aminés suivants de la série L: valine, alanine, acide α -aminobutyrique, norvaline, isovaline, thréonine, allothréonine, leucine, isoleucine, alloisoleucine, hydroxyproline, phénylalanine, acide aspartique, cystine, ainsi que l'acide DL-

glutamique, la DL-proline, la DL-thréonine, la DL-méthionine, la DL-éthionine, l'acide DL- α -aminobutyrique, la DL-valine, l'acide DL-pipécolique, la D-thréonine.

La substance est dissoute dans un grand volume d'acétone et l'on sèche la solution sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration, on concentre la solution à un petit volume. On ajoute un volume égal de benzène à la solution acétonique et on précipite le DNP-aminoacide par un excès d'éther de pétrole (E: 30-75°). Le dérivé est séché sous un courant d'air, dissous dans l'éther et précipité avec de l'éther de pétrole. L'étape éther-éther de pétrole est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que le DNP-aminoacide cristallise à basse température.

(ii) *Cas des DNP-aminoacides précipités sous forme solide.* Glutamine, L-sérine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-arginine, L-histidine, acide L- α,γ -diaminobutyrique, L-ornithine, L-lysine, acide γ -aminobutyrique et L-asparagine.

Les précipités sont lavés à l'eau glacée et cristallisés à partir de solvants appropriés (voir Tableau I).

b. Cas particuliers de synthèse

1. Acide DNP-L-glutamique

(i) *Procédé de RAO ET SOBER*⁶⁹. A cause des difficultés de cristallisation, les auteurs partent de la DNP-glutamine, facilement cristallisable, qui est hydrolysée une nuit avec 10 fois le volume d'acide chlorhydrique 6 N et chauffée au bain-marie jusqu'à ce que le produit passe en solution. La solution refroidie à la température du laboratoire est placée ensuite dans un congélateur jusqu'à ce qu'une huile visqueuse jaune se sépare, qui cristallise après un séjour de plusieurs semaines dans le froid. Le DNP-aminoacide, lavé à l'eau et desséché sur P₂O₅ dans le vide, se présente sous forme d'un solide jaune hygroscopique.

(ii) *Procédé de LEVY ET CHUNG*⁴⁵. L'acide L-glutamique (2.9 g) et le carbonate de sodium anhydre (6.0 g) sont dissous dans 100 ml d'eau à 40°. Le fluorodinitrobenzène (3.7 g) est ajouté et le mélange agité vigoureusement par un agitateur magnétique, la température étant maintenue à 40° pendant 30 min. Après acidification par de l'acide chlorhydrique concentré, l'acide DNP-glutamique recueilli est recristallisé du mélange chloroforme-acétate d'éthyle (F: 134-136°).

2. Dérivés de l'histidine

(i) *α -Mono-DNP-histidine* (composé présentant une réaction de Pauly positive et ne donnant pas la réaction à la ninhydrine). Le dérivé monosubstitué en position α de l'histidine s'obtient en faisant réagir 0.5 molécule (ou moins) de fluorodinitrobenzène et 1.0 molécule d'histidine. Le mode opératoire adopté par RAMACHANDRAN ET McCONNELL⁶⁸ est le suivant: 1.917 g (0.01 mole) de monochlorhydrate de L-histidine et 8.4 g de bicarbonate de sodium sont dissous dans 200 ml d'eau et on ajoute 0.453 g (0.0025 mole) de fluorodinitrobenzène dans 25 ml d'éthanol. Après un contact de 1 h à la température du laboratoire, le volume est réduit sous vide à 50 ml et le pH ajusté à 6.5 par de l'acide chlorhydrique pur ajouté avec précaution. Le précipité est éliminé par filtration et recristallisé à partir d'une solution dans le volume minimum

d'éthanol aqueux. Les cristaux jaunes et brillants obtenus après 18 h de séjour à basse température sont recueillis et séchés sous vide à 60°. F (non corrigé) : 278–280° (décomposition).

(ii) *Di-DNP-histidine* (voir plus haut). Le dérivé dinitrophénylé s'obtient en faisant réagir un excès de fluorodinitrobenzène (2.5 moles par molécule d'histidine d'après RAMACHANDRAN ET MCCONNELL⁶⁸). Cristallisation à partir de l'acétone aqueuse.

(iii) *Imidazole-DNP-histidine* (composé non coloré donnant une coloration brune à la ninhydrine et ne présentant pas la réaction de Pauly). La synthèse est faite à partir de l' α -acétylhistidine (synthèse de BERGMANN ET ZERVAS⁸). Après dinitrophénylation, on hydrolyse l' α -acétyl-mono-DNP-imidazole-histidine par l'acide chlorhydrique à 20% à l'ébullition (MARGOLIASH⁵⁴). On peut également obtenir l'imidazole-DNP-histidine après hydrolyse du peptide DNP-histidylhistidine. Mais l'hydrolysat contient également de la di-DNP-histidine et aussi parfois de l' α -mono-DNP-histidine.

3. *O-DNP-tyrosine* (synthèse de SANGER⁷⁷)

La N-acétyl-L-tyrosine (0.55 g) (DU VIGNEAUD ET MEYER²⁶) est traitée en milieu bicarbonaté pendant 4 h avec 2.0 g de chlorodinitrobenzène dissous dans l'éthanol. Après acidification, il se sépare une huile qui cristallise partiellement. La N-acétyl-O-DNP-tyrosine est hydrolysée 3 h à reflux avec de l'acide chlorhydrique à 20%. Après refroidissement et évaporation à un petit volume, on obtient un précipité qui est séparé par filtration, dissous dans l'acide nitrique dilué chaud et neutralisé avec de la pyridine, tandis qu'il est encore chaud. L'O-DNP-tyrosine cristallise en aiguilles blanches contenant 1 molécule d'eau de cristallisation (F: 202°).

4. α -Mono-DNP-arginine (PORTER ET SANGER⁶⁷)

La condensation se fait en milieu éthanol aqueux. 3 moles d'acide aminé, 1.1 g de bicarbonate de sodium sont dissous dans 14 ml d'eau. On ajoute 1.1 g (6 mmoles) de fluorodinitrobenzène dans 28 ml d'éthanol. Le mélange est agité 2 h à la température du laboratoire et concentré pour éliminer l'éthanol.

Après enlèvement de l'éthanol du milieu réactionnel, le résidu est traité avec de l'eau: la DNP-arginine est insoluble. Après filtration, elle est lavée à l'éthanol et à l'éther. Elle est recristallisée à partir d'une solution d'acide chlorhydrique dilué, qui est neutralisée par l'ammoniaque.

5. Dérivés de l'ornithine

(i) α -Mono-DNP-ornithine. Après dinitrophénylation de la δ -benzoyl-ornithine (SANGER⁷⁷), on hydrolyse l' α -DNP- δ -benzoyl-ornithine.

Le monochlorhydrate de DL-ornithine (0.3 g) (dérivé préparé à partir du bichlorhydrate par la méthode de RIVARD⁷³) est converti en son complexe cuivrique (voir plus loin, paragraphe 5 (ii)) et la solution refroidie est benzoylée de la manière habituelle par 0.32 ml de chlorure de benzoyle et en présence de 6 ml de NaOH N. Le dérivé benzoylé insoluble est séparé par filtration, mis en suspension dans 2 ml d'eau

et traité par l'hydrogène sulfuré. La solution est portée à l'ébullition et filtrée chaude. Après concentration du filtrat à 5 ml environ, la δ -benzoyl-DL-ornithine cristallise (0.14 g). Elle est mise en suspension dans 2 ml d'eau contenant 0.3 g de bicarbonate de sodium et agitée pendant 2 h avec une solution de 0.2 ml de fluorodinitrobenzène dans 4 ml d'éthanol. Après élimination de l'éthanol sous pression réduite, l'excès de fluorodinitrobenzène est enlevé par l'éther sulfurique et la solution est acidifiée. L' α -DNP- δ -benzoyl-DL-ornithine précipite immédiatement sous la forme d'un solide amorphe (rendement = 0.2 g). L'enlèvement du groupe benzoyle se fait par chauffage pendant 4 jours à 105° dans un tube scellé sous vide avec un mélange de 2 ml de HCl 10 N et de 2 ml d'acide acétique pur cristallisable. Après refroidissement, la solution est évaporée à siccité et le résidu dissous dans l'eau. Le produit non hydrolysé (quelquefois en quantité importante) est extrait par l'acétate d'éthyle et, après neutralisation de la solution aqueuse avec de la pyridine, l' α -DNP-ornithine cristallise (F: 227°).

Plutôt que d'avoir recours à la technique précédente, nous préférons dinitrophényler la δ -carboboxy-DL-ornithine (voir paragraphe 6 (i), la préparation de l' ε -carboboxy-lysine) et enlever le groupement carboboxy par hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5.6 N à 100° pendant 24 h.

(ii) δ -DNP-L-ornithine. Elle se prépare par dinitrophénylation du complexe cuivrique du monochlorhydrate de la L-ornithine (SANGER⁷⁷).

0.1 g du monochlorhydrate de L-ornithine est dissous dans 5 ml d'eau chaude et traité par un excès de carbonate de cuivre. Après filtration, la solution est évaporée jusqu'à un volume d'environ 2 ml et on ajoute 0.3 g de bicarbonate de sodium et une solution de 0.2 ml de fluorodinitrobenzène dans 4 ml d'éthanol. Le mélange est agité pendant 2 h à la température du laboratoire. Le complexe cuivrique de la δ -DNP-ornithine précipite sous la forme d'une poudre verdâtre. Après filtration et dissolution dans l'acide chlorhydrique dilué, la solution est traitée par de l'hydrogène sulfuré et filtrée sur charbon. Après concentration, le chlorhydrate de δ -DNP-L-ornithine cristallise. Il est recristallisé à partir d'une solution dans l'acide chlorhydrique N (F: 228°, décomposition).

(iii) Di-DNP-ornithine. Elle s'obtient facilement par les méthodes classiques (excès de fluorodinitrobenzène).

6. Dérivés de la lysine

(i) α -Mono-DNP-L-lysine. Elle peut être obtenue par dinitrophénylation de l' ε -benzoyl-lysine, de l' ε -acétyl-lysine ou de l' ε -carboboxy-lysine, suivie d'une hydrolyse spécifique du groupe protecteur du radical ε -aminé.

ε -Benzoyl-lysine (SANGER⁷⁰). La méthode est peu commode.

ε -Acétyl-lysine. Ce dérivé est préparé par la méthode de NEUBERGER ET SANGER⁶¹. Après dinitrophénylation de l' ε -acétyl-lysine, l' α -DNP- ε -acétyl-lysine est extraite par l'éther de la solution acide. Le déblocage du groupe acétyl se fait par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 2 h sous pression ("15 lb. steam pressure"). L'acide est chassé sous pression réduite et l' α -DNP-lysine est précipitée par la pyridine (FOLK²⁷) (F: 270°, décomposition).

ε-Carbobenzoxy-L-lysine. Ce dérivé est préparé soit par la méthode de BERGMANN et coll.⁹, soit par la méthode de NEUBERGER ET SANGER⁶¹.

Le monochlorhydrate de lysine (1.8 g) (préparé à partir du dichlorhydrate par la méthode décrite par RICE⁷²) est traité en solution aqueuse à chaud par un excès de carbonate de cuivre. L'excès de carbonate de cuivre est éliminé par filtration. On ajoute 5 ml de soude 2 *N* et la solution bleu foncé est refroidie dans la glace. Le chlorure de carbobenzoxy (2 ml) et la soude 2 *N* (10 ml) sont ajoutés en 10 portions pendant 30 min sous agitation, en refroidissant et en prenant soin que la solution ne devienne trop alcaline. Le complexe cuivrique de l'*ε*-carbobenzoxy-lysine précipite. Après filtration, il est lavé à l'éthanol et à l'eau et mis en suspension dans 20 ml d'eau. On fait passer un courant d'hydrogène sulfuré. La solution portée à l'ébullition est filtrée chaude et l'*ε*-carbobenzoxy-lysine cristallise en fines aiguilles. On la recristallise de sa solution aqueuse.

La dinitrophénylation de l'*ε*-carbobenzoxy-lysine s'effectue par les méthodes habituelles et l'hydrolyse de l' α -DNP-*ε*-carbobenzoxy-lysine est réalisée en milieu chlorhydrique 5.6 *N* pendant 16 h, à 100°.

(ii) *ε*-Mono-DNP-lysine. Sa préparation se fait par dinitrophénylation du complexe cuivrique du monochlorhydrate de L-lysine (PORTER ET SANGER⁶⁷).

La L-lysine (0.5 g) est dissoute dans 10 ml d'eau et le carbonate de cuivre est ajouté lentement à la solution bouillante. L'excès de carbonate de cuivre est éliminé par filtration. On ajoute un excès de bicarbonate de sodium et une solution de 1.5 g de fluorodinitrobenzène dans 20 ml d'éthanol. Le mélange est agité 2 h à la température du laboratoire. Le précipité jaune verdâtre est recueilli par filtration, lavé à l'eau, à l'éthanol et à l'éther. Il est mis en suspension dans 5 ml d'eau et une quantité suffisante d'acide chlorhydrique *N* est ajoutée pour obtenir une solution claire. La solution est refroidie dans la glace et on fait passer un courant d'hydrogène sulfuré pendant 2 min. On ajoute une trace de charbon et le mélange est immédiatement filtré. Le filtrat est évaporé rapidement à siccité sous pression réduite. Le produit est cristallisé à partir de sa solution dans l'acide chlorhydrique à 20%.

(iii) *Di*-DNP-lysine. Elle est obtenue facilement par les méthodes classiques (voir procédé de LEVY ET CHUNG, paragraphe B, a, 1, p. 226). Elle est recristallisée du méthanol aqueux.

7. Dérivés de la cystine

(i) *Mono*-DNP-cystine (BETTELHEIM¹⁰). 1.2 g de L-cystine et 2 g de carbonate de sodium sont dissous dans 50 ml d'eau; on ajoute 0.9 g de fluorodinitrobenzène dissous dans 5 ml d'éthanol. Après 20 min d'agitation, le pH est ajusté à 7 par de l'acide chlorhydrique et la cystine non dinitrophénylée précipite. La solution est de nouveau acidifiée et concentrée. Le chlorure de sodium est précipité par l'acétone. Après dessiccation, le résidu est lavé à l'éther et cristallisé de sa solution aqueuse (F: 187°, non corrigé).

(ii) *Di*-DNP-cystine. Elle est préparée par les méthodes classiques. Sa cristallisation peut se faire à partir de l'éther monoéthylique de l'éthylène-glycol aqueux. On la recristallise de sa solution dans l'acide acétique dilué (PORTER ET SANGER⁶⁷).

(iii) *S-DNP-cystéine*. Après dinitrophénylation du glutathion réduit, l'hydrolysat total contient la *S-DNP-cystéine* (hydrosoluble) et l'acide *DNP-glutamique* (éthéro-soluble) (HAUSMANN, WEISIGER ET CRAIG³²).

(iv) *Acide DNP-cystéique* (sel de potassium). Pour obtenir ce dérivé dinitrophénylé hydrosoluble, il est commode d'oxyder par l'acide performique la di-*DNP-cystine* (BETTELHEIM¹⁰).

On oxyde 0.2 g de di-*DNP-L-cystine* par 10 ml d'acide performique (9 ml d'acide formique pur + 1 ml d'eau oxygénée à 110 volumes) pendant 30 min. La solution est évaporée à siccité, et le résidu est dissous dans un peu d'eau. La solution est ajustée à pH 6 avec de la potasse et cristallise par addition d'éthanol et d'éther.

C. DINITROPHÉNYLATION D'UN HYDROLYSAT DE PROTÉINE (Tableau II)

a. Hydrolyse de la protéine

3 à 5 mg de protéine sont hydrolysés en tube scellé sous vide par 1 à 2 ml d'acide chlorhydrique 5.7 *N** à 105° pendant 24 h**. L'acide chlorhydrique de l'hydrolysat est très soigneusement éliminé.

b. Condensation avec le fluorodinitrobenzène; extraction des dérivés dinitrophénylés

Différentes modalités de condensation des acides aminés avec le fluorodinitrobenzène ont été décrites. On peut effectuer la réaction soit en milieu aqueux, soit en milieu hydro-alcoolique.

1. Réaction de condensation en milieu aqueux (LEVY *et al.*⁴⁰)

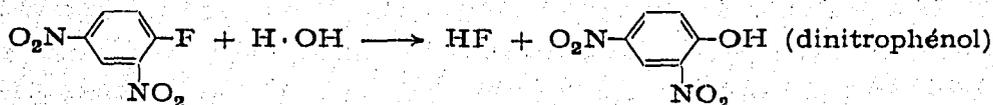
(i) *Conduite de la réaction*. L'hydrolysat (3 à 5 mg dans 3 ml) est placé dans une cellule de synthèse (voir Fig. 1). On ajoute 0.1 ml de chlorure de potassium 3.1 *N* et le contenu est ajusté à pH 9.0 (environ 40 μ moles de NaOH 0.2 *N*). La solution est saturée en fluorodinitrobenzène à 40° par agitation vigoureuse avec un léger excès (environ 0.1 ml) de réactif. Le pH est maintenu à 9 pendant 80 min par des additions intermittentes de soude 0.2 *N*. Cette opération peut être effectuée commodément au moyen d'un autotitrateur de JACOBSEN ET LEONIS³⁷.

La cinétique de la réaction peut être suivie en mesurant la consommation de soude (Fig. 2). Étant donné que le fluorodinitrobenzène est en excès, le milieu réactionnel reste saturé en réactif et la formation de dinitrophénol*** est constante dans

* L'acide chlorhydrique est préparé en distillant 3 à 4 fois dans un appareil en verre un mélange azéotropique d'acide chlorhydrique et d'eau.

** Habituellement la durée de l'hydrolyse est de 24 h; il peut être intéressant d'effectuer le dosage des acides aminés sur plusieurs séries d'hydrolysats obtenus à des temps différents (24 et 48 h, par exemple).

*** Outre la réaction de condensation avec les acides aminés [FDNB + H₂N-CH(R)-COOH → DNP-HN-CH(R)-COOH + HF], il se produit également une hydrolyse alcaline du réactif



le temps ($0.044 \mu\text{mole/ml/min}$) (LEVY⁴³). L'extrapolation au temps zéro de la pente finale de la courbe linéaire qui résulte de la formation du dinitrophénol indique le nombre de μmoles de soude consommées au cours de la réaction de condensation avec les acides aminés (Fig. 2).

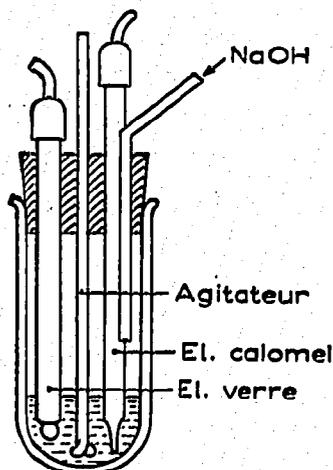


Fig. 1. Cellule de synthèse pour le dinitrophénylation des acides aminés. El. verre = électrode de verre; El. calomel = électrode au calomel.

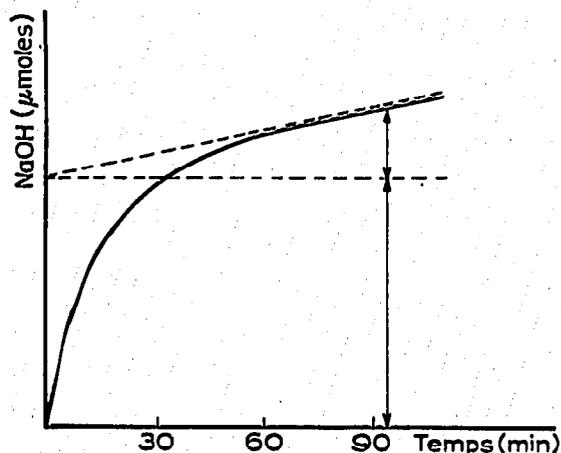


Fig. 2. Étude graphique de la consommation de soude au cours de la dinitrophénylation. L'extrapolation au temps zéro de la pente finale de la courbe, qui résulte de la formation du dinitrophénol, indique le nombre de μmoles de soude consommées au cours de la réaction de condensation avec les acides aminés.

FRAENKEL-CONRAT ET SINGER²⁹ ont décrit également une réaction de condensation dans du tampon carbonate à 5% de pH 9.3 pendant 3 h à 40° . La quantité de fluorodinitrobenzène est de $15 \mu\text{l}$ pour 2 mg d'acides aminés.

(ii) *Extraction des dérivés dinitrophénylés.* Lorsque la réaction de condensation est terminée, le contenu de la cellule est versé quantitativement dans une ampoule à décanter et extrait avec de l'éther privé de peroxydes* (2 à 4 fois 5 ml) pour éliminer l'excès de fluorodinitrobenzène. Ensuite, le mélange est acidifié (0.5 ml de HCl 5 N) et les DNP-aminoacides éthersolubles sont extraits par de l'éther (5 fois 5 ml). LEVY⁴³ prélève des parties aliquotes de la solution étherée (3 parties de 2 ml) qui sont évaporées à sec. Les résidus secs sont dissous dans l'acétone et leur solution est déposée sur des feuilles de papier Whatman No. 1. Nous préférons le mode opératoire suivant.

La phase étherée est concentrée soigneusement dans des capsules de verre jusqu'à un volume réduit; la couche étherée, qui surnage au-dessus de quelques gouttelettes d'eau, est versée quantitativement dans des récipients spéciaux (Fig. 3) en vue de la sublimation du dinitrophénol (technique personnelle dérivée de celle de MILLS, voir plus loin).

* Pour éviter la transformation de la DNP-méthionine en DNP-méthionine-sulfone, il est indispensable d'employer de l'éther privé de peroxydes. On peut le distiller sur du chlorure stanneux, puis on le lave avec une solution de carbonate de sodium à 20% et avec de l'eau; on le conserve sur du sulfate ferreux pulvérisé, à l'abri de la lumière. On peut aussi priver l'éther de peroxydes par passage sur une colonne d'alumine activée (DASLER ET BAUER²¹).

La phase aqueuse restant après l'extraction des DNP-aminoacides éthérosolubles contient encore l' α -mono-DNP-arginine et l' α -DNP-histidine (et éventuellement l'acide DNP-cystéique)*. Elle peut être traitée de différentes façons.

D'après LEVY⁴³, la phase aqueuse est diluée à 10 ml et des parties aliquotes (3 fois 1 ml) sont évaporées à sec. Après dissolution dans un volume connu d'acétone, la solution de DNP-aminoacides est déposée sur des feuilles de papier Whatman No. 1.

Nous préférons, comme KOCH ET WEIDEL³⁹, extraire plusieurs fois la phase aqueuse restante par un mélange à volume égal de *sec.*-butanol et d'acétate d'éthyle. Après dessiccation, les DNP-aminoacides hydrosolubles sont dissous dans un volume connu (3 ml, par exemple) d'acétone**. Des parties aliquotes de cette solution (50 à 150 μ l) sont déposées sur du papier Whatman No. 1.

2. Réaction de condensation en milieu hydro-alcoolique

Pour obtenir la transformation totale de l'histidine en di-DNP-histidine, en évitant la formation d' α -mono-DNP-histidine (voir plus haut), FRAENKEL-CONRAT ET SINGER²⁹ réalisent la condensation avec le fluorodinitrobenzène en milieu hydro-alcoolique suivant les modalités techniques suivantes.

La condensation s'effectue dans un milieu contenant 0.7% de bicarbonate de sodium, 1.7% de fluorodinitrobenzène et 67% d'éthanol, pendant 80 min à 20–25°. L'excès de fluorodinitrobenzène est extrait à l'éther après évaporation de la plus grande partie de l'alcool. Le milieu réactionnel est ensuite acidifié (aux environs de pH 1–2) et extrait d'abord à l'éther privé de peroxydes, puis à l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction quantitative de la di-DNP-histidine. La phase aqueuse restante ne contient que l' α -mono-DNP-arginine et éventuellement l'acide DNP-cystéique.

Nous préférons utiliser le mode opératoire suivant.

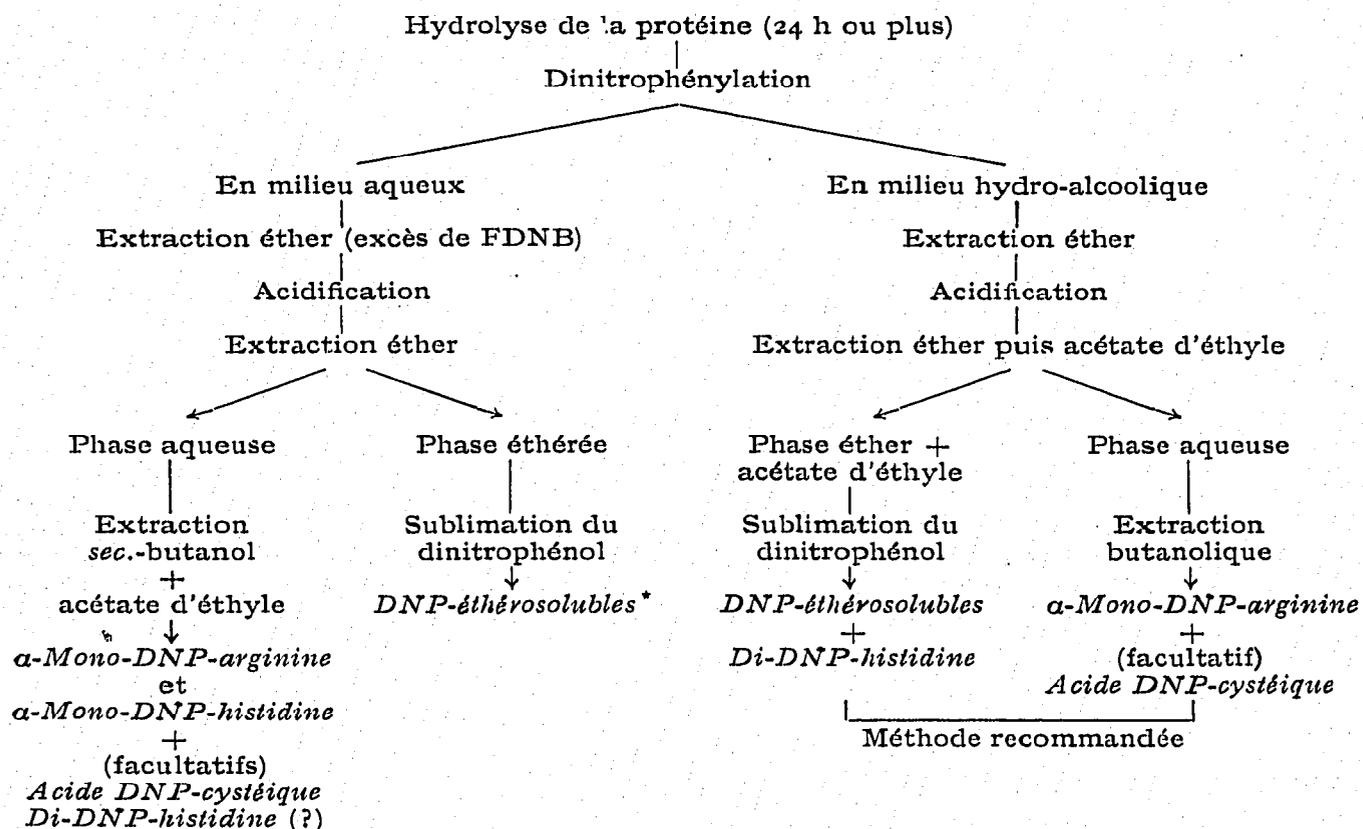
L'hydrolysate (10 mg de protéine) est dissous dans 5 ml d'eau bidistillée amenée et maintenue à 40°. On ajuste à pH 9 par de la soude *N*/15 et on ajoute 0.2 ml de fluorodinitrobenzène. On agite pendant 15 min à 40° en maintenant le pH à 9. On ajoute alors 10 ml d'éthanol absolu et on continue l'agitation pendant 90 min à 40° en maintenant toujours le pH à 9. Après la condensation, l'alcool est chassé par ventilation d'air froid. L'excès de fluorodinitrobenzène est extrait plusieurs fois (5 à 10 fois) par de l'éther privé de peroxydes. Le milieu est acidifié (1 ml d'acide chlorhydrique concentré pur) et extrait de nouveau par l'éther privé de peroxydes (5 extractions) puis par l'acétate d'éthyle (3 extractions). La phase aqueuse résiduelle est extraite par le mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et de *sec.*-butanol (3 extractions).

Les extractions par l'éther (en milieu acide) et par l'acétate d'éthyle sont rassemblées et évaporées à sec, et le dinitrophénol contenu dans cette phase est éliminé par sublimation (voir plus loin la description de la technique employée). Les DNP-aminoacides sont dissous dans 2 ml d'acétone.

* L'acide DNP-cystéique peut se trouver dans les hydrolysats totaux de protéine oxydée par l'acide performique ou dans les hydrolysats totaux oxydés par l'acide performique.

** Pour faciliter la dissolution des DNP-aminoacides hydrosolubles on peut utiliser de l'acétone acide (acétone 0.9 ml + acide chlorhydrique *N* 0.1 ml).

TABLEAU II
DOSAGE DES ACIDES AMINÉS SOUS LA FORME DE LEURS DÉRIVÉS DINITROPHÉNYLÉS
(Méthode de Levy⁴³)



* *Remarque*: On fera attention à la di-DNP-histidine, qui peut accompagner en très faible quantité les DNP-aminoacides éthérosolubles.

Les extraits butanoliques sont également évaporés à sec, puis dissous dans l'acétone (1 à 2 ml). Des parties aliquotes (correspondant à 0.1-0.3 mg de protéine) des solutions acétoniques des résidus des DNP-éthéro- et hydrosolubles sont déposées sur des feuilles de papier Whatman No. 1.

c. Sublimation du dinitrophénol

L'élimination du dinitrophénol se fait classiquement par sublimation (MILLS⁵⁸). Le dispositif de sublimation que nous utilisons est représenté sur la Fig. 3. Cet appareil est conçu pour que la distance entre le film chauffé de dérivés dinitrophénylés et la surface de verre refroidie (neige carbonique + acétone dans le réfrigérant) soit très courte.

Les extraits étherés sont placés dans les fioles spéciales et évaporés à siccité. Si, après évaporation de l'éther, il reste une gouttelette d'eau dans la fiole, on place un

chapeau de verre (sans tube réfrigérant) sur le rodage de la fiole. L'eau est facilement éliminée sous pression réduite en quelques minutes. La sublimation du dinitrophénol s'effectue à 70–80° (les fioles ne sont plongées dans le bain-marie qu'après l'établissement du vide) pendant 30 min*.

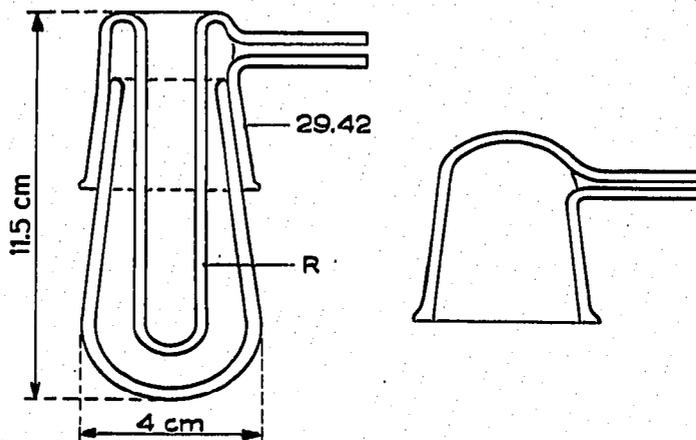


Fig. 3. Appareil employé pour la sublimation du dinitrophénol. Le joint conique de l'appareil est un rodage normalisé 29-42. Le réfrigérant (R) est rempli par le mélange acétone + neige carbonique. Le chapeau de verre sans réfrigérant (partie droite de la figure) permet l'élimination des gouttelettes d'eau après l'évaporation de la solution étherée et avant la sublimation elle-même.

D. DINITROPHÉNYLATION D'UNE PROTÉINE (Tableau III)

La dinitrophénylation d'une protéine a été décrite pour la première fois par SANGER⁷⁰. Plusieurs procédés peuvent être employés.

a. Technique de condensation avec le fluorodinitrobenzène

La condensation peut s'effectuer sur les protéines natives, dénaturées ou oxydées.

Avec les protéines natives, un petit nombre de groupements ϵ -aminés des résidus intrapeptidiques de lysine et de noyaux imidazole de résidus d'histidine peuvent ne pas être substitués par le fluorodinitrobenzène (PORTER⁶⁵). Cette absence de réactivité ne gêne nullement la détermination des résidus d'acides aminés en position N-terminale.

Dans le cas de la cystine ou d'un demi-résidu de cystine en position N-terminale (cas du chymotrypsinogène, BETTELHEIM¹⁰), il est indispensable de faire l'identification sous la forme d'acide DNP-cystéique. On peut pour cela dinitrophényler la protéine oxydée ou oxyder la DNP-protéine. L'oxydation de la protéine doit être réalisée d'une façon très douce, notamment par les procédés de THOMPSON⁸⁷ et de HIRS^{34**}.

* Au cours de la sublimation, la DNP-méthionine peut être légèrement entraînée avec le dinitrophénol.

** Pour éviter la destruction des DNP-aminoacides, il est indispensable d'éliminer toute trace d'eau oxygénée. On peut obtenir ce résultat par précipitation de la DNP-protéine oxydée par l'éther privé de peroxydes, suivie par une dissolution dans l'acide formique et une reprécipitation à l'éther. Cette opération est répétée 3 fois.

1. Condensation en milieu éthanol-bicarbonate (SANGER⁷⁰)

La protéine (0.5 g par exemple) et le bicarbonate de sodium (0.5 g) sont dissous dans 5 ml d'eau. On ajoute à la solution 10 ml d'une solution éthanolique à 5% (v/v) de fluorodinitrobenzène et le mélange est agité mécaniquement pendant 2 à 3 h à l'obscurité et à la température du laboratoire.

La dinitrophénylation d'une protéine insoluble nécessite la prolongation du temps d'agitation (48 h à 40°, 72 h à 20°) et des additions répétées de bicarbonate de sodium et de fluorodinitrobenzène.

Après sa dinitrophénylation totale, la DNP-protéine est souvent insoluble, même en milieu alcalin; d'autre part, après acidification du milieu, la plupart des DNP-protéines précipitent. Après centrifugation, le précipité est lavé plusieurs fois à l'eau (pour enlever les sels minéraux), à l'alcool jusqu'à obtention d'un liquide surnageant incolore (pour éliminer l'excès de fluorodinitrobenzène et le dinitrophénol formé) et finalement à l'éther sulfurique.

La conduite de ces étapes de lavage peut être modifiée suivant les solubilités particulières des DNP-protéines (solubilité dans l'eau de la DNP-salmine et du DNP-ovocomucoïde, qui sont précipitables par un excès d'éthanol, solubilité dans l'eau et dans l'alcool de la DNP-glycoprotéine acide α_1 du sérum ou DNP-orosomucoïde). L'élimination des réactifs ou des artefacts de condensation peut toujours être obtenue par dialyse et la solution de DNP-protéine peut être lyophilisée.

2. Condensation en milieu aqueux

LEVY ET LI⁴⁷ ont décrit une réaction de condensation en milieu aqueux maintenu à pH 8 à l'aide d'un auto-titrateur (modèle JACOBSEN-LEONIS, par exemple).

La protéine (0.2 μ mole au minimum) est dissoute dans 3 ml de chlorure de potassium 0.1 M à 40°. Le pH est ajusté et maintenu à 8 par des additions de potasse 0.05 N. Après l'addition du fluorodinitrobenzène (0.1 ml environ), la solution est agitée vigoureusement. La réaction de condensation est terminée après 90 à 120 min d'agitation: la courbe de consommation de la potasse en fonction du temps s'infléchit lorsque la réaction se termine; la pente constante de la courbe correspond alors à l'hydrolyse du fluorodinitrobenzène.

La DNP-protéine peut rester soluble dans le milieu réactionnel, qui est alors extrait 3 fois à l'éther pour enlever l'excès de fluorodinitrobenzène. Après acidification, la DNP-protéine précipite. Elle est recueillie par centrifugation, lavée à l'eau, à l'acétone et à l'éther, et séchée sur P₂O₅.

3. Condensation en milieu bicarbonate-chlorhydrate de guanidine

D'après PHILLIPS⁶⁴, on obtient un rendement plus satisfaisant en groupes terminaux en réalisant la dinitrophénylation en milieu bicarbonate de potassium et chlorhydrate de guanidine. Le mode opératoire préconisé est le suivant.

La protéine est dissoute dans une solution de chlorhydrate de guanidine 6 M (concentration 20 mg de protéine/ml). On ajoute du bicarbonate de potassium solide

à la concentration de 10–15 mg/ml et du fluorodinitrobenzène à la concentration de 0.05–0.1 ml/ml. Le mélange est agité à 20° pendant un temps qui peut varier de 6 à 24 h. Il est ensuite acidifié, dilué avec 3 volumes d'eau et extrait une fois à l'éther, les deux phases étant facilement séparées par centrifugation.

Le précipité de DNP-protéine est lavé à l'eau plusieurs fois par centrifugation. Les dernières traces de réactif et de dinitrophénol sont éliminées par trois lavages à l'acétone et un lavage à l'éther.

b. Détermination de la quantité de protéine dans la DNP-protéine

Pour déterminer le nombre de molécules d'acides aminés en position N-terminale par molécule de protéine, il est indispensable de connaître exactement la quantité de protéine contenue dans la DNP-protéine. En première approximation, 80% du poids de DNP-protéine correspondent à la protéine initiale.

Avec les procédés de synthèse décrits plus haut (notamment le procédé de condensation en milieu éthanol-bicarbonate), il est possible d'opérer soigneusement et quantitativement et de tenir compte exclusivement du poids de protéine mis en œuvre au moment de la réaction de condensation.

Il est beaucoup plus commode de doser, dans la protéine et dans la DNP-protéine obtenue, un groupement ou un résidu qui n'a pas été modifié par la réaction de condensation: le groupement amide ne réagit pas avec le fluorodinitrobenzène et peut être dosé simplement et d'une façon précise.

Selon SANGER⁷⁶, la DNP-protéine est hydrolysée dans l'acide chlorhydrique 2 *N* bouillant pendant 4 h. Après neutralisation, l'ammoniaque libérée est distillée dans un appareil de microkjeldahl à 95°, en employant un tampon borate de pH 9.5.

Selon THOMPSON⁸⁵, la DNP-protéine est hydrolysée 9 h à 105° en tube scellé avec de l'acide chlorhydrique 2 *N*. Après neutralisation avec de la soude 2 *N* à pH 5 (vert de bromocrésol), l'ammoniaque est distillée après addition de tampon phosphate 0.15 *M* de pH 10.5.

Signalons également que le poids moléculaire de la DNP-protéine peut être calculé lorsque le nombre total de résidus d'acides aminés de la protéine est entièrement connu, en supposant que les résidus intrapeptidiques de lysine, de tyrosine, d'histidine, de cystéine et tous les résidus en position N-terminale ont été substitués. Il suffit d'ajouter au poids moléculaire de la protéine la valeur obtenue en multipliant par 166 le nombre total de radicaux dinitrophényle introduits.

c. Hydrolyse de la DNP-protéine

1. Hydrolyse totale de la DNP-protéine

Les conditions d'hydrolyse totale de la protéine, en vue de la détermination du résidu d'acide aminé en position N-terminale, varient suivant les substrats et suivant la nature de l'acide aminé terminal. Il est nécessaire que l'hydrolyse soit assez poussée pour que l'hydrolysât ne contienne pas (ou peu) de DNP-peptides et qu'elle ne soit

pas trop longue pour éviter au maximum la destruction du DNP-aminoacide terminal (pour le taux de destruction des DNP-aminoacides au cours de l'hydrolyse, voir: Chromatographie quantitative, paragraphe J, p. 269).

Pour la détermination qualitative du résidu N-terminal, l'hydrolyse s'effectue habituellement en tube scellé sous vide (ou sous azote) pendant 16 h à 105° en présence d'acide chlorhydrique 5.7 *N* redistillé (voir: Hydrolyse de la protéine, paragraphe C, a, p. 232).

Ce type d'hydrolyse peut toutefois provoquer une destruction importante de la DNP-proline et du DNP-glycocolle.

L'hydrolyse de la DNP-proline pendant 16 h par de l'acide chlorhydrique 12 *N* entraîne une destruction de plus de 50%*. Au cours de l'hydrolyse, la DNP-proline peut former, par rupture du noyau, deux dérivés particuliers, l'acide α -chloro- δ -DNP-aminovalérique et l'acide δ -chloro- α -DNP-aminovalérique (voir paragraphe G, a, 5, p. 253).

Après 8 h d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5.7 *N*, 60% du DNP-glycocolle sont détruits (PORTER⁶⁶).

Pour éviter au maximum ces destructions, il est recommandé d'effectuer, en plus de l'hydrolyse à 105° pendant 16 h, deux autres hydrolyses:

pour le DNP-glycocolle, hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5.7 *N* 4 h; dans ces conditions, il est indispensable de préciser si l'hydrolysate contient des DNP-peptides;

pour la DNP-proline, hydrolyse pendant 4 h par de l'acide chlorhydrique 11.2 *N* (PORTER ET SANGER⁶⁷, PHILLIPS⁶⁴). SHEPHERD *et al.*⁸³ conseillent également une hydrolyse de 24 h à 105° par un mélange à parties égales d'acide acétique et d'acide chlorhydrique.

La destruction des DNP-aminoacides au cours de l'hydrolyse acide est très nettement augmentée en présence de tryptophane ou de protéines riches en tryptophane comme le lysozyme (THOMPSON⁸⁴). La xanthylation du tryptophane ou de la protéine réduit très nettement le taux de destruction (DICKMAN ET ASPLUND²⁵), le dixanthyltryptophane étant stable à l'hydrolyse acide. Il y a donc parfois intérêt à réaliser la xanthylation de la DNP-protéine. La DNP-protéine est dissoute dans de l'acide acétique à 90% en présence de xanthidol. Après une heure de contact à la température du laboratoire, la xanthyl-DNP-protéine est précipitée par l'éther et lavée à l'éther par centrifugation.

2. Hydrolyse partielle acide de la DNP-protéine

Il y a intérêt parfois à hydrolyser partiellement la DNP-protéine de façon à isoler et à déterminer la structure des DNP-peptides de la séquence N-terminale. Cette hydrolyse partielle peut s'obtenir par l'action de l'acide chlorhydrique 12 *N* à 37° ou de l'acide chlorhydrique 5.6 *N*, 3 *N* et 0.1 *N* à 100° pendant des temps variables.

* Une hydrolyse par l'acide acétique à 96% pendant 16 h à 100° détruit également 50% de la DNP-proline. Dans ces conditions, la DNP-protéine n'est pas totalement hydrolysée (SCANES ET TOZER⁸¹).

3. Hydrolyse enzymatique de la DNP-protéine

Les enzymes protéolytiques peuvent hydrolyser partiellement certaines DNP-protéines. Habituellement la vitesse de réaction est nettement réduite et le degré d'hydrolyse sensiblement abaissé. L'hydrolyse enzymatique permet également d'aborder le problème de la structure des DNP-peptides de la séquence N-terminale. Des exemples intéressants ont été décrits: par exemple, hydrolyse pepsique de la DNP-ribonucléase (ANFINSEN *et al.*²), hydrolyse trypsique spécifique de la DNP-ribonucléase oxydée (REDFIELD ET ANFINSEN⁷⁰), hydrolyse par la carboxypeptidase d'une DNP-protéine en vue de la détermination de la séquence C-terminale (WALDSCHMIDT-LEITZ ET GAUSS⁹⁰).

d. Extraction des dinitrophénylaminoacides

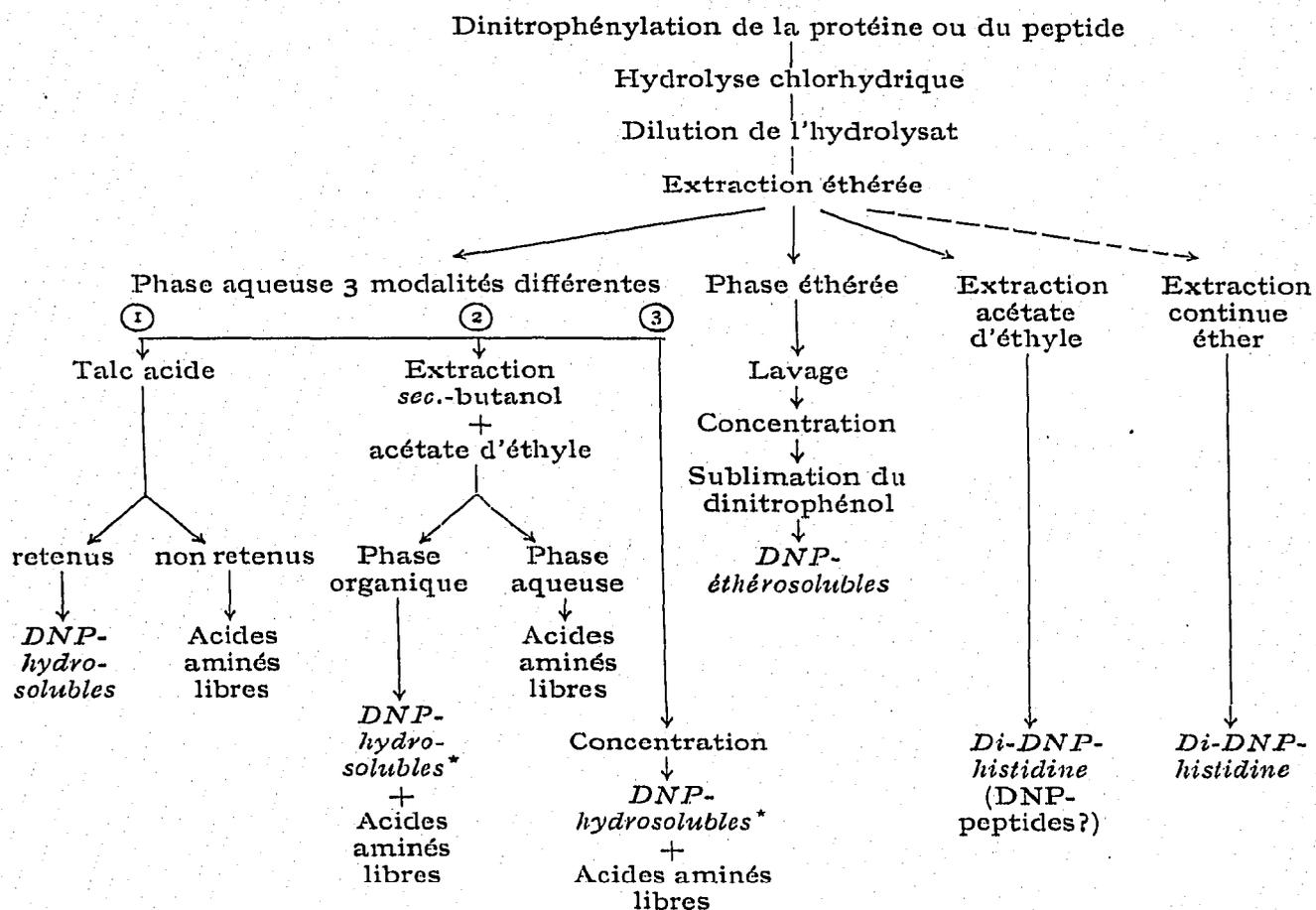
1. Extraction à partir d'un hydrolysats total de protéines

Après l'hydrolyse, les hydrolysats sont dilués avec de l'eau pour obtenir une concentration sensiblement normale en acide chlorhydrique. L'hydrolysats dilué est extrait 4 fois par 5 ml d'éther privé de peroxydes (voir note p. 233). Les extraits éthers sont lavés avec de l'acide chlorhydrique 0.1 N (PHILLIPS⁶⁴) ou bien 3 fois à l'eau (THOMPSON⁸⁵) pour éliminer toute trace des dérivés acidosolubles (comme l' ϵ -mono-DNP-lysine) qui peuvent avoir été entraînés au cours de l'extraction. Les extraits éthers sont concentrés et le dinitrophénol qui les souille est éliminé par sublimation suivant les modalités techniques décrites plus haut (paragraphe C, c, p. 235). Les DNP-aminoacides éthérosolubles sont dissous dans un volume déterminé d'acétone. Une partie aliquote de cette solution est déposée sur des feuilles de papier Whatman No. 1. Les DNP-aminoacides éthérosolubles peuvent contenir des traces de di-DNP-histidine lorsque celle-ci existe en position N-terminale. Une extraction continue à l'éther dans un appareillage spécial (MILLS⁵⁸) permet d'obtenir également ce dérivé dans la fraction éthérosoluble. Une extraction par l'acétate d'éthyle, après l'extraction étherée, conduit aussi à l'isolement de ce composé, mais il faut se rappeler que ce dernier solvant peut également extraire des DNP-peptides éventuellement présents (voir paragraphe D, d, 2, p. 242).

La phase aqueuse résiduelle de l'hydrolysats contient tous les aminoacides libres, toujours des DNP-aminoacides hydrosolubles comme l' ϵ -mono-DNP-lysine, l'O-DNP-tyrosine (incolore), l'imidazole-DNP-histidine et éventuellement la S-DNP-cystéine, qui proviennent des résidus correspondants d'aminoacides en position intrapeptidique. On peut également trouver l' α -mono-DNP-arginine, l'acide DNP-cystéique (hydrolysats oxydé de protéine ou hydrolysats de protéine oxydée), la di-DNP-histidine (si l'hydrolysats n'a pas été extrait d'une façon continue à l'éther, ou par la combinaison successive éther et acétate d'éthyle), l' α -mono-DNP-histidine, lorsque ces résidus d'acides aminés existent en position N-terminale dans la protéine.

Les dérivés dinitrophénylés hydrosolubles peuvent être extraits (mais ce n'est pas nécessaire) par le *sec.*-butanol. Les phases organiques ainsi obtenues et la phase aqueuse restante sont évaporées à sec, reprises dans un volume connu d'acétone

TABLEAU III
 DÉTERMINATION DE L'ACIDE AMINÉ PORTEUR D'UN GROUPE α -AMINÉ TERMINAL LIBRE
 (Méthode de SANGER⁷⁸)



* Les DNP-hydrosolubles contiennent:

(1) *Dérivés provenant d'acides aminés non-terminaux*: ϵ -mono-DNP-lysine, imidazole-DNP-histidine (incolore), O-DNP-tyrosine (incolore), S-DNP-cystéine (incolore); éventuellement (peptides bactériens) δ -mono-DNP-ornithine et acide γ -mono-DNP-diaminobutyrique.

(2) *Dérivés provenant d'acides aminés terminaux*: α -mono-DNP-arginine, di-DNP-histidine, α -mono-DNP-histidine, acide DNP-cystéique; cas particuliers: α -mono-DNP-lysine, α -mono-DNP-ornithine, acide α -mono-DNP-diaminobutyrique.

(légèrement acide si c'est nécessaire) et étudiées en chromatographie de partage sur papier. La séparation des dérivés dinitrophénylés de la phase aqueuse et des acides aminés libres (tous les acides aminés constitutifs plus quelques molécules de lysine et d'histidine "non réactives") peut être obtenue sur une colonne de talc (SANGER⁷⁸). Le résidu aqueux est dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique *N* et passé sur une colonne (2.5 cm de diamètre) qui contient un mélange de 20 g d'Hyflo-Super-Cel et 50 g de talc* imbibé d'acide chlorhydrique *N*. Les acides aminés libres ne sont pas

* Il est indispensable d'éliminer les fines particules de talc qui gênent l'écoulement. Par ébullition de la suspension de talc dans l'acide chlorhydrique 0.01 *N*, les fines particules se rassemblent à la surface du liquide et peuvent être enlevées facilement. Le lavage est répété plusieurs fois de suite (BAILEY ET BETTELHEIM⁶).

Bibliographie p. 269/271.

adsorbés tandis que tous les dérivés dinitrophénylés (sauf l'acide cystéique, REDFIELD ET ANFINSEN⁷⁰) le sont. Après un lavage soigneux de la colonne avec de l'acide chlorhydrique (100 ml), les dérivés dinitrophénylés sont élués par 400 ml d'alcool chlorhydrique (alcool: 4 vol., acide chlorhydrique *N*: 1 vol.). L'éluat peut être obtenue également par l'éthanol à 80% contenant 0.3% d'ammoniaque (BAILEY ET BETTELHEIM⁵). L'éluat peut être évaporé. Si le résidu est traité par le fluorodinitrobenzène, l' ϵ -DNP-lysine devient de la di-DNP-lysine, l'O-DNP-tyrosine de la di-DNP-tyrosine, l'imidazole-DNP-histidine de la di-DNP-histidine, tandis que l' α -mono-DNP-arginine n'est pas modifiée. Après cette seconde dinitrophénylation, l'extrait étheré du résidu enlève la di-DNP-lysine et la di-DNP-tyrosine, une extraction à l'acétate d'éthyle peut enlever la di-DNP-histidine, tandis que l' α -mono-DNP-arginine reste dans la phase aqueuse (voir ROVERY, FABRE ET DESNUELLE⁷⁵).

2. Extraction d'un hydrolysats partiel de protéine

Les modalités d'extraction sont identiques à celles des hydrolysats totaux. Des extractions successives à l'éther, à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol (WOOLLEY⁹⁴, SANGER⁷⁸) peuvent réaliser un certain fractionnement de base du mélange.

Il est très important de pouvoir séparer aussi complètement que possible les α -DNP-peptides de la séquence N-terminale dont la forme acide est, en principe, soluble dans les solvants organiques, et les peptides non terminaux colorés en jaune et contenant de l' ϵ -DNP-lysine qui sont, en principe, retenus dans la phase aqueuse par leur groupement aminé libre. Cette séparation n'est malheureusement pas toujours très nette (DESNUELLE ET FABRE²³, SCHROEDER⁸²).

Les extraits à l'acétate d'éthyle peuvent contenir de l' ϵ -mono-DNP-lysine. Il est utile de laver les diverses phases organiques plusieurs fois à l'eau et d'étudier la composition de ces liquides de lavage.

Les peptides contenant de l' ϵ -DNP-lysine peuvent être séparés des autres peptides non dinitrophénylés et des acides aminés libres sur une colonne (1 cm de diamètre) contenant 5 g de talc lavé à l'acide chlorhydrique *N* (SANGER⁷⁸). Les peptides contenant de l' ϵ -DNP-lysine sont fixés sur la colonne. Après lavage par l'acide chlorhydrique *N* (40 ml), leur éluat est obtenue par un mélange d'éthanol (4 parties) et d'acide chlorhydrique (1 partie) ou, de préférence, par de l'éthanol à 80% contenant 0.3% d'ammoniaque.

E. DINITROPHÉNYLATION D'UN PEPTIDE

La dinitrophénylation d'un peptide peut se conduire en pratique exactement de la même façon que celle d'une protéine. Cependant, quelques méthodes (des micro-méthodes surtout) sont spécialement adaptées à cette réaction de condensation. Les quantités de peptides employées sont généralement très petites.

1. Condensation en milieu triméthylamine (SANGER ET THOMPSON⁷⁰)

Le remplacement du bicarbonate de sodium par la triméthylamine permet la diminution de l'ionisation du milieu; d'autre part, ce dernier réactif est commodément

éliminé par la suite. Le peptide (0.2 μ mole par exemple) est dissous dans 0.1 ml de triméthylamine à 1%. On ajoute une solution de 10 μ l de fluorodinitrobenzène dans 0.2 ml d'éthanol. Après 2 heures de contact, quelques gouttes d'eau et de la solution de triméthylamine sont ajoutées et l'excès de fluorodinitrobenzène est extrait 3 fois à l'éther ou à l'éther contenant 1% de triéthylamine (HAUSMANN *et al.*³²). Après évaporation à sec de la solution aqueuse, le résidu est hydrolysé directement par de l'acide chlorhydrique 5.7 N.

2. Condensation en milieu carbonate de triméthylamine

Pour réduire la formation de dinitrophénol, LOCKHART ET ABRAHAM⁵⁰ remplacent la triméthylamine par le carbonate de triméthylamine d'après le mode opératoire suivant.

Le peptide (50-150 μ g) est dissous dans 0.1 ml d'une solution à 1.5% de carbonate de triméthylamine (poids/vol.) (pH 9.3). On ajoute 0.01 ml de fluorodinitrobenzène dans 0.2 ml d'éthanol et la réaction se poursuit à l'obscurité pendant 2 h 30 min. L'éthanol est chassé sous pression réduite et on ajoute 0.24 ml de solution de carbonate de triméthylamine. L'excès de fluorodinitrobenzène est extrait à l'éther et la solution aqueuse est évaporée à siccité sous vide. Le résidu, dissous dans 0.1 ml d'acide chlorhydrique 6 N, est hydrolysé pendant 9 h à 105° dans un tube scellé sous azote. L'hydrolysate est dilué avec 2 vol. d'eau et les DNP-aminoacides éthérosolubles sont extraits 3 fois avec un volume égal d'éther sulfurique. La di-DNP-histidine, si elle est présente, peut être extraite avec le *n*-butanol ou l'acétate d'éthyle.

WALEY⁵¹ préconise une méthode assez voisine de la précédente avec un tampon carbonate de triméthylamine obtenu par traitement d'une solution à 6% (vol./vol.) de triméthylamine par du gaz carbonique jusqu'à alcalinité au rouge de phénol, mais neutralité à la phénolphthaléine. Dans ces conditions, la réaction de dinitrophénylation est conduite à un pH un peu plus bas que dans la méthode de LOCKHART ET ABRAHAM. Il se forme un peu de dinitrophénol.

F. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES DÉRIVÉS DINITROPHÉNYLÉS ÉTHÉROSOLUBLES

La séparation de tous les dérivés dinitrophénylés éthérosolubles doit se faire à l'aide d'une chromatographie bidimensionnelle.

Trois types de chromatogramme peuvent être employés. Exceptionnellement, dans les cas de mélanges très simples, on peut se contenter d'une (ou plusieurs) chromatographies unidimensionnelles, à condition de se repérer par rapport à des témoins latéraux de DNP-aminoacides.

a. Solvants "toluène" et "phosphate" (BISERTE ET OSTEUX¹¹, LEVY⁴³)

La cuve pour la première dimension ascendante de la chromatographie est constituée par un récipient en verre, cylindrique ou parallélépipédique (hauteur: 46 cm, base de 23 \times 23 cm) qui doit être très hermétiquement fermé par une plaque de verre bien

plate. L'étanchéité de la cuve est assurée par un dépôt de lubrifiant à base de silicone sur les bords de la cuve ou mieux par un joint de caoutchouc mousse placé entre les bords de la cuve et le couvercle. Un poids assure le maintien en place de ce couvercle. Dans le fond de la cuve, on dispose l'un dans l'autre deux cristallisoirs à fond bien plat (diamètres 19 cm et 15 cm) qui laissent subsister entre eux un espace annulaire important. L'ensemble est placé à l'obscurité dans une chambre à température constante ($21^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$).

La première dimension de la chromatographie est réalisée avec le système "toluène" de BISERTE ET OSTEUX¹¹ modifié par LEVY⁴³, dont la composition est la suivante: toluène-pyridine-monochlorhydrine du glycol (ou 2-chloroéthanol)-ammoniaque 0,8 N (30:9:18:18). Les différents réactifs doivent être très soigneusement purifiés*.

Le solvant "toluène", qui est biphasique, est équilibré après une seule agitation de l'ampoule au moins pendant 3 à 4 h. La phase aqueuse inférieure est rejetée et la

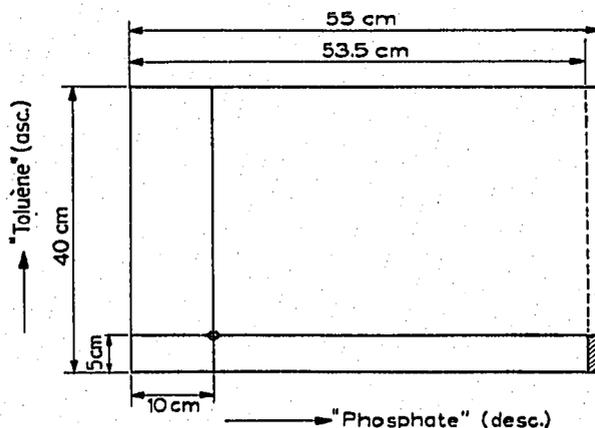


Fig. 4. Disposition du chromatogramme (papier Whatman No. 1). desc. = chromatographie descendante; asc. = chromatographie ascendante. Après avoir roulé en cylindre la feuille de papier et agrafé les deux bords, il est recommandé de découper une surface de papier (surface hachurée de la figure; 5×1.5 cm) afin d'éviter une montée trop rapide du solvant "toluène" par capillarité.

phase organique est filtrée sur du papier Whatman No. 1 pour enlever les quelques gouttelettes d'eau qui restent.

Les dérivés dinitrophenylés en solution acétonique sont déposés à l'aide d'une micropipette dans le coin d'une feuille de papier Whatman No. 1 (40×55 cm) (voir Fig. 4). Après le dépôt des DNP-aminoacides, la feuille de papier est roulée en cylindre (la forme cylindrique est maintenue par des agrafes).

Le rouleau est posé dans l'espace annulaire compris entre les deux cristallisoirs. On place dans le cristallisoir central 200 ml d'ammoniaque 0,8 N (57 ml d'ammoniaque concentrée à 22° Bé, densité = 0,925, dans 1 l d'eau) et, directement dans le fond de

* *Toluène*: une extraction par de l'acide sulfurique pur (100 ml d'acide par l de toluène) pendant 24 h; après décantation, distillation sur chlorure d'aluminium, lavage au carbonate de sodium à 20%, lavage à l'eau à plusieurs reprises (5 fois), filtration sur un filtre contenant des morceaux de papier qui servent à fixer l'eau, conservation sur du chlorure de calcium sec et redistillation; *chloroéthanol*: distillation; *pyridine*: distillation sur baryte et redistillation.

la cuve, en dehors des cristallisoirs, 30 à 40 ml de la phase organique du solvant "toluène" préparé comme il est indiqué ci-dessus. La cuve à chromatographie est très soigneusement fermée et on laisse s'équilibrer le papier avec l'atmosphère de la cuve au minimum pendant 5 à 6 h. La prolongation de ce temps d'équilibration (24 h par exemple) améliore encore la séparation. Il faut signaler que des chromatogrammes plus satisfaisants sont obtenus dans des cuves en état d'utilisation continue.

Au bout de ce temps, on verse rapidement dans l'espace annulaire et à l'aide d'un entonnoir à longue tige, une quantité suffisante (50 ml) de phase organique du solvant "toluène". La chromatographie ascendante dure 15 h. Le lendemain, les feuilles sont enlevées, séchées par ventilation d'air tiède pendant 10 à 12 h à l'abri de la lumière sous une sorbonne. L'enlèvement du solvant de la première dimension doit être complet.

La feuille est alors dépliée, retournée et placée dans une cuve en verre (dimensions: hauteur 48 cm, base 46 × 36 cm) bien étanche, pour une chromatographie descendante avec un système solvant constitué par un tampon phosphate 1.5 M de pH 6: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 1 M, PO_4HNa_2 0.5 M, soit 138 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 71 g de PO_4HNa_2 par l, ou 156 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 89 g de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sel de Sørensen) par l*.

La chromatographie peut être mise en route immédiatement sans temps d'équilibration. Il est nécessaire de placer dans le fond de la cuve un godet rempli d'eau. La durée de la chromatographie est de 15 h dans une salle à température constante ($+ 21^\circ \pm 0.5^\circ$) et à l'obscurité. Le chromatogramme est séché pendant 6 h au moins par ventilation d'air tiède dans une sorbonne obscure.

Ce type de chromatographie bidimensionnelle permet de séparer la plupart des DNP-aminoacides éthérosolubles, sauf les DNP-aminoacides dicarboxyliques (acide DNP-aspartique, acide DNP-glutamique). Ces deux dérivés peuvent être séparés en effectuant un second chromatogramme, en première dimension avec le système "toluène", en seconde dimension avec du tampon phosphate de concentration plus forte (2.5 M), la chromatographie descendante étant prolongée pendant 48 h. La séparation obtenue dans le cas d'un mélange de DNP-aminoacides éthérosolubles d'un hydrolysats total de protéine est schématisée dans la Fig. 5.

Il n'est pas nécessaire de définir la position de chaque tache par des R_F dans les deux dimensions. En effet, la position relative de chaque dérivé est toujours très caractéristique, et, de plus, les valeurs de R_F , notamment dans le solvant "toluène", peuvent varier, dans une certaine limite, suivant le type de cuve à chromatographie. Parmi les autres causes de variations des R_F , on peut encore citer le degré de saturation de l'atmosphère de la cuve, le vieillissement du solvant "toluène", la distance parcourue par le front du solvant, la composition du mélange et la quantité de DNP-aminoacides. Dans le cas de mélanges simples, dans lesquels plusieurs DNP-aminoacides sont absents, l'identification exacte se fait aisément et sûrement en plaçant sur le

* Il est recommandé de préparer un tampon de molarité plus élevée: 3 M ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 2 M PO_4HNa_2 1 M, soit 312 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 178 g de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sel de Sørensen) par l). Cette solution peut être diluée au moment de la mise en route du chromatogramme. Elle est conservée à l'étuve à 37° .

cercle de départ, en même temps que le mélange à étudier, un certain nombre de témoins-internes qui peuvent venir "encadrer" les taches d'identification délicate. Les traces de dinitrophénol qui peuvent encore se trouver dans les mélanges à étudier et qui se décolorent facilement et entièrement au contact de vapeurs d'acide formique,

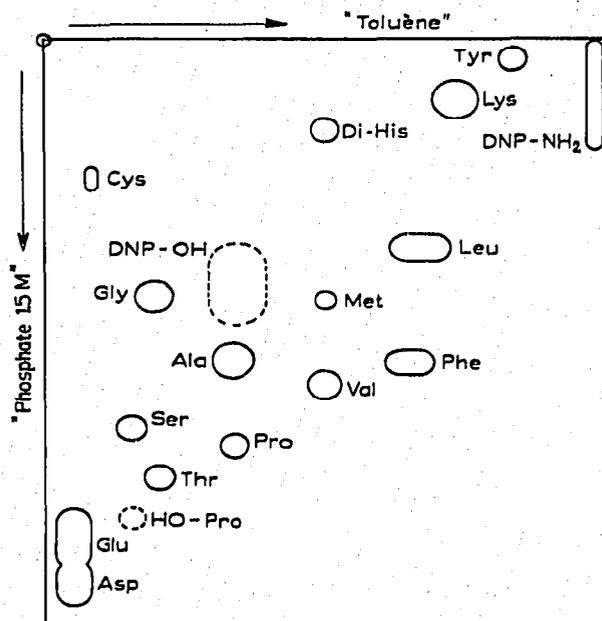


Fig. 5. Carte chromatographique des DNP-aminoacides éthérosolubles d'un hydrolysats total de protéine. Systèmes solvants "toluène" et "phosphate 1,5 M". DNP-NH₂ = dinitraniline; DNP-OH = dinitrophénol. Sur le schéma, les dinitrophénylaminoacides sont notés comme les acides aminés correspondants, ex.: Ala = DNP-alanine. HO-Pro = DNP-hydroxyproline; Di-His = di-DNP-histidine.

servent également de repère pour l'identification des DNP-aminoacides. Le repérage et la localisation de faibles quantités de DNP-aminoacides sont facilités par un examen *rapide* en lumière de Wood (fluorescence brune); la 2,4-dinitraniline, qui est un artefact constant de la méthode, présente dans ces conditions une fluorescence très particulière de teinte jaune vert. Elle possède d'ailleurs un R_F voisin de 1 dans le système "toluène" et très faible dans le tampon phosphate.

b. Solvants "n-butanol-NH₃" et "phosphate"

BRAUNITZER¹⁵ a préconisé l'emploi en première dimension ascendante du système *n*-butanol saturé par de l'ammoniaque à 0.1% (poids/vol.) (voir aussi KOCH ET WEIDEL³⁰, DAVIES ET HARRIS²²). On peut également employer le système propanol-ammoniaque à 0.2% (poids/vol.) (75:25). Il est préférable de réaliser la chromatographie sur du papier Schleicher et Schüll No. 2043a ou 2043b.

La seconde dimension est faite soit avec le tampon phosphate 1.5 M (pH 6) de LEVY (KOCH ET WEIDEL³⁰), soit avec un tampon phosphate plus dilué, 0.75 M de pH 6 (DAVIES ET HARRIS²²). La durée de la chromatographie avec le phosphate 0.75 M est réduite à 7-8 heures.

Bibliographie p. 269/271.

Les modalités expérimentales pour la conduite de la chromatographie sont en tous points comparables à celles que nous avons décrites pour la chromatographie "toluène" et "phosphate". La position des DNP-aminoacides éthersolubles est schématisée dans la Fig. 6.

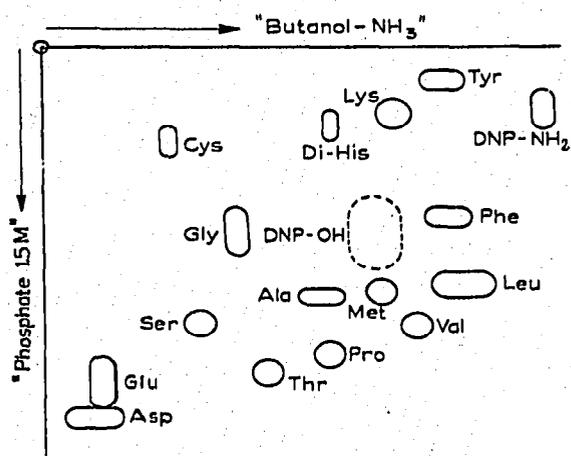


Fig. 6. Carte chromatographique des DNP-aminoacides éthersolubles d'un hydrolysats total de protéine. Systèmes solvants "butanol- NH_3 " et "phosphate 1.5 M". DNP- NH_2 = dinitraniline; DNP-OH = dinitrophénol; Di-His = di-DNP-histidine.

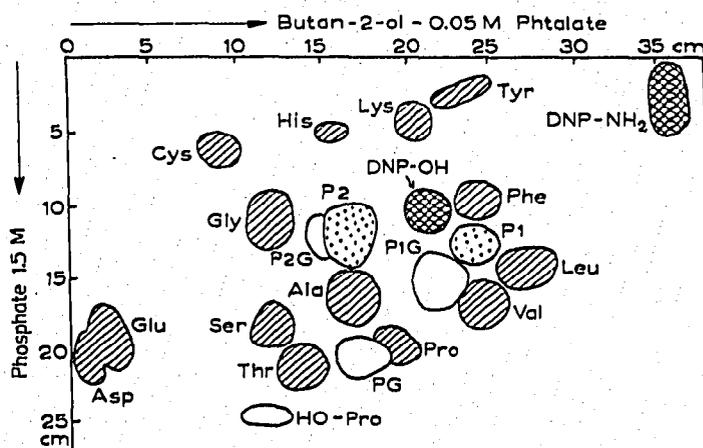


Fig. 7. Carte chromatographique des DNP-aminoacides éthersolubles d'un hydrolysats total de protéine. Systèmes solvants "sec.-butanol-phthalate pH 6" et "phosphate 1.5 M" (d'après PHILLIPS⁶⁴). DNP-OH = dinitrophénol; DNP- NH_2 = dinitraniline; P₁ = acide δ -chloro- α -DNP-aminovalérique; P₂ = acide α -chloro- δ -DNP-aminovalérique; PG = DNP-prolylglycine; P₁G = δ -chloro- α -DNP-aminovalérylglycine; P₂G = probablement α -chloro- δ -DNP-aminovalérylglycine.

lérylglycine. Les DNP-aminoacides éthersolubles habituellement rencontrés dans un hydrolysats sont indiqués par des surfaces hachurées. Les produits de décomposition de la DNP-proline sont figurés par des surfaces pointillées. L' ϵ -DNP-lysine (hydrosoluble) coïncide avec la DNP-sérine.

c. Solvants "sec.-butanol-phthalate pH 6" et "phosphate"

PHILLIPS⁶⁴ a décrit une chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman No. 7 dans laquelle la première dimension s'effectue avec le solvant butan-2-ol saturé avec le tampon phtalate 0.05 M de pH 6* (durée de développement 15 à 20 h). Le papier est, au préalable, tamponné avec le tampon phtalate 0.05 M. La seconde dimension est réalisée avec le système tampon phosphate 1.5 M de pH 6 de LEVY (durée de développement: une nuit) (Fig. 7).

d. Solvants "alcool tert.-amylique-phthalate pH 6" et "phosphate 1.5 M"

PHILLIPS⁶⁴ a également proposé un couplage bidimensionnel constitué en première dimension ascendante par le système de BLACKBURN ET LOWTHER¹³ (alcool tert.-amylique—ou 2-méthylbutan-2-ol—saturé avec le tampon phtalate 0.05 M de pH 6* ; durée de développement dans l'obscurité: 30-40 h). Une équilibration prolongée

* Formule du tampon phtalate: 50 ml de diphtalate de potassium 0.1 M (20.418 g par l) et 45.45 ml de NaOH 0.1 N; diluer à 100 ml avec de l'eau privée de CO_2 .

(une nuit) de la feuille avant le départ de la chromatographie améliore les résultats (INGRAM ET SALTON³⁰). La seconde dimension est réalisée avec le tampon phosphate 1.5 *M* de pH 6 de LEVY, après un séchage à la température du laboratoire.

Avant la première dimension, les feuilles de papier Whatman No. 7 sont tamponnées avec le tampon phtalate 0.05 *M* de pH 6. Le papier Whatman No. 4 ou 3 MM est parfois employé avec le système solvant de BLACKBURN ET LOWTHER (LOCKHART, ABRAHAM ET NEWTON⁵¹).

e. Valeurs comparées des différentes techniques

Ces différentes techniques diffèrent essentiellement entre elles par la nature et la composition du système solvant de la première dimension. Il est remarquable de constater que la répartition générale et les positions relatives des dérivés dinitrophénylés sont toujours sensiblement les mêmes, quel que soit le système solvant employé en première dimension. Il ne semble donc pas que la séparation réalisée soit la conséquence directe des lois de la chromatographie de partage pure. D'autre part, la chromatographie en seconde dimension consiste essentiellement en un "relargage" tout le long de la feuille de papier.

Suivant les couplages réalisés, la position du dinitrophénol, qui est le principal artefact de la méthode de SANGER⁷⁰, peut varier d'une façon importante. Dans le couplage "toluène + phosphate", le dinitrophénol est voisin du DNP-glycocolle et de la DNP-alanine. Dans les couplages "*n*-butanol-NH₃ + phosphate" et "sec.-butanol-phtalate pH 6 + phosphate", le dinitrophénol est beaucoup plus près de l'ensemble DNP-phénylalanine, DNP-leucine, DNP-valine, DNP-méthionine, et cette position est beaucoup plus gênante. Ces inconvénients sont naturellement réduits si le dinitrophénol a été éliminé par sublimation.

Néanmoins, en définitive, nous pensons que la résolution la plus satisfaisante est obtenue par le système "toluène + phosphate 1.5 *M*". L'utilisation d'un tampon phosphate 0.75 *M* permet de réduire la durée de la seconde dimension. Il est certain, toutefois, comme le signale PHILLIPS⁶⁴, qu'il y a certains inconvénients à employer le système "toluène-pyridine-chloroéthanol-ammoniaque" dans les laboratoires où l'on effectue des dosages d'acides aminés par les méthodes colorimétriques à la ninhydrine.

f. Autres systèmes solvants

Tous les problèmes posés par la séparation des DNP-aminoacides éthérosolubles peuvent être résolus par les couplages bidimensionnels décrits ci-dessus. Quelques problèmes simples peuvent être abordés par l'emploi de l'un des systèmes solvants précédents en chromatographie unidimensionnelle, à condition de placer sur le chromatogramme des substances-témoins de référence (témoins latéraux et témoins internes). Toutefois, d'autres systèmes solvants ont été proposés. Leur emploi est cependant limité à quelques problèmes très particuliers. Parmi ceux qui sont les plus utiles, citons:

Eau-benzène-acide acétique (1:1:1) (PARTRIDGE ET DAVIS, cité dans SANGER ET

THOMPSON⁷⁹), utilisable pour les DNP-aminoacides de R_F faible dans les solvants organiques: acide DNP-aspartique, acide DNP-glutamique, DNP-sérine et éventuellement acide DNP-cystéique.

*Systèmes solvants de MELLON et coll.*⁵⁵ (voir Tableau IV):

Solvant A = *n*-butanol saturé d'eau;

Solvant B = *n*-butanol-acétate de *n*-butyle-ammoniaque à 1% (v/v) (1:2:3) (préparé 18 h avant l'usage);

Solvant C = benzène-acide acétique à 1%; la chromatographie est ascendante, sur papier Whatman No. 1; le papier est équilibré une nuit avant la mise en place du solvant organique; le système solvant C donne des traînées.

TABLEAU IV
VALEURS DES R_F DES 2,4-DINITROPHÉNYLAMINOACIDES
(D'après MELLON, KORN ET HOOVER⁵⁵)

Acides aminés	Solvant A*	Solvant B	Solvant C
Dinitroaniline	0.90	0.97	0.96
Di-DNP-tyrosine	0.78	0.90	0.33
Leucine	0.74	0.71	0.70
Isoleucine	0.73	0.70	0.70
Di-DNP-lysine	0.72	0.81	0.11
Phénylalanine	0.71	0.70	0.55
Tryptophane	0.70	0.68	0.28
Valine	0.68	0.47	0.63
Méthionine	0.65	0.48	0.47
Dinitrophénol	0.56	0.25	0.99
Alanine	0.50	0.18	0.28
Proline	0.48	0.17	0.44
Thréonine	0.43	0.12	0
Glycocolle	0.36	0.08	0.07
Sérine	0.32	0.06	0
Acide glutamique	0.14	0	0
Acide aspartique	0.12	0	0
Di-DNP-histidine	0.35	0.50	0
Arginine	0.37	0	0
ϵ -DNP-lysine	0.32	0.05	0
α -DNP-lysine	0.33	0	0

* Pour la composition des solvants, voir le texte.

*Système iso-octane-monochlorhydrine du glycol-*n*-propanol (20:1:1)* (WILLIAMSON ET PASSMANN⁸²): Séparation de la DNP-leucine et de la DNP-phénylalanine.

Système décaline (décahydronaphtalène)-acide acétique pur cristallisable (1:1) (BISERTE ET OSTEUX¹¹), utilisable pour la séparation chromatographique du dinitrophénol et des DNP-aminoacides.

n-Propanol (dilué avec de l'eau pour obtenir une densité de 0.813)-acide acétique (contenant 1.5% d'eau)-kérosène ($E: 100-140^\circ$) (20:6:100), en chromatographie descendante sur Whatman No. 1 trempé dans l'acide citrique 0.1 M et séché à l'air; utilisable pour la séparation des polymères d' α -, β - et ω -aminoacides (HEIKENS, HERMANS ET VAN VELDEN³³).

Bibliographie p. 269/271.

Xylène-acide acétique-tampon phtalate 0.05 M de pH 6 (10:5:4) (LANDMANN, DRAKE ET WHITE⁴²); le papier est tamponné avec le même tampon, puis équilibré avec la couche inférieure 16 h avant la mise en route.

n-Butanol-éthanol-eau (40:10:50) (v/v) (KENT, LAWSON ET SENIOR³⁸).

Alcool benzylique additionné de 10% d'éthanol (v/v) et saturé avec le tampon phtalate 0.05 M de pH 6 (BLACKBURN ET LOWTHER¹³) (voir Tableau V).

Propanol-cyclohexane ou éther de pétrole (E: 100-120°) (30:70 v/v), saturé avec le tampon phtalate 0.05 M de pH 6 (BLACKBURN ET LOWTHER¹³) (voir Tableau V).

TABLEAU V

R_F DES DNP-AMINOACIDES SUR PAPIER TAMPONNÉ (TAMPON PHTALATE DE pH 6)
(D'après BLACKBURN ET LOWTHER¹³)

	Cyclohexane contenant 30% de propanol	Alcool tert.-amylique	Alcool benzylique contenant 10% d'éthanol
DNP-leucine	0.28	0.88	0.71
DNP-valine	0.23	0.79	0.59
DNP-phénylalanine	0.22	0.74	0.63
DNP-alanine	0.15	0.46	0.36
DNP-glycocolle	0.10	0.23	0.26
DNP-thréonine	0.07	0.36	0.26
DNP-sérine	0.05	0.21	0.18
Acide DNP-glutamique	0.05	0.04	0.07
Acide DNP-aspartique	0.02	lent	0.03

Tampon citrate de sodium-acide chlorhydrique M ou 0.7 M de pH 6.2 (ROVERY ET FABRE⁷⁴, DESNUELLE ET FABRE²³); durée: 16 h; c'est en fait une application de la chromatographie dite "de relargage", comparable à celle réalisée avec le tampon phosphate 1.5 M de pH 6 de LEVY.

Solvant de BLACKBURN ET LOWTHER modifié: tert.-pentanol contenant 10% (v/v) de propan-2-ol saturé avec du tampon phtalate (GREGORY ET YOUNG, résultats non publiés, cités dans WALEY⁹¹).

Chloroforme-acide acétique 1.5 N-n-propanol (10:6:10) (SANGER ET THOMPSON⁷⁹); chromatographie en phase inversée sur du papier siliconé (KRITCHEVSKY ET TISELIUS⁴¹); le papier est suspendu dans la cuve saturée de vapeurs de la phase organique pendant 3 h; puis le développement se fait avec la phase aqueuse; la di-DNP-tyrosine et la di-DNP-lysine ne migrent pas, tandis que les autres DNP-aminoacides migrent assez rapidement. A cause de la variabilité des R_F , il est indispensable de mettre des témoins latéraux de DNP-aminoacides.

Chloroforme-propan-2-ol-benzoate de potassium 0.05 M (45:49:6 v/v) ou cyclohexane-propan-2-ol-benzoate de potassium 0.05 M (60:36:4 v/v) (MONIER ET PENASSE⁶⁰).

Solvant alcool n-amylique agité avec un volume égal de solution d'ammoniaque 2 N; la phase aqueuse est utilisée pour la saturation de la cuve (BOWES ET MOSS¹⁴).

Alcool tert.-amylique-méthyléthylcétone-benzoate de potassium (54:40:6) (MONIER ET JUTISZ⁵⁰).

G. MODALITÉS D'APPLICATION PARTICULIÈRES DE LA CHROMATOGRAPHIE
DES DNP-AMINOACIDES ÉTHÉROSOLUBLES*a. Hydrolysats totaux d'une DNP-protéine et DNP-aminoacides
d'un hydrolysat total*

Tous les problèmes peuvent être abordés par les couplages bidimensionnels décrits ci-dessus. Nous donnons cependant la préférence aux systèmes "toluène" et "phosphate 1.5 M". Quelques cas particuliers sont très délicats à résoudre. Il est parfois nécessaire d'éluer les taches de DNP-aminoacides du chromatogramme afin de pouvoir les étudier de nouveau avec d'autres systèmes solvants.

1. Éluition des taches de DNP-aminoacides

L'éluition du papier est conduite de la façon suivante. Les zones de papier contenant les DNP-aminoacides sont découpées, placées dans des tubes à centrifuger et éluées par 2 à 3 ml de bicarbonate de sodium à 2% pendant 15 min à une température de 50-55°. Après refroidissement et acidification du milieu par de l'acide chlorhydrique dilué, les DNP-aminoacides sont extraits par l'éther sulfurique privé de peroxydes. Afin d'éliminer des liqueurs étherées toute trace de solvant employé au cours de la première chromatographie, celles-ci sont de nouveau soumises à une extraction par 2 à 3 ml de bicarbonate de sodium à 2% et, après acidification, la seconde solution bicarbonatée est extraite à l'éther. Cette solution étherée (2 à 3 ml au maximum) peut être déshydratée sur du sulfate de sodium anhydre. Après évaporation ou concentration, les DNP-aminoacides sont alors déposés sur la feuille de papier Whatman No. 1 et soumis à une chromatographie unidimensionnelle dans le nouveau système solvant.

2. Séparation des acides DNP-dicarboxyliques

Seuls, les acides DNP-aspartique et DNP-glutamique ne sont pas séparés par les couplages bidimensionnels. Ce problème peut être résolu par une seconde chromatographie bidimensionnelle dans laquelle la deuxième dimension est réalisée avec un tampon phosphate de concentration plus élevée (2.5 M), la première dimension pouvant se faire cette fois de préférence avec le système butanol (NH₃) qui s'évapore plus rapidement que le système "toluène".

On peut aussi éluer du chromatogramme bidimensionnel les taches des DNP-aminoacides dicarboxyliques et soumettre l'éluat à une chromatographie unidimensionnelle dans le système alcool isoamylique saturé d'acide acétique à 1% (R_F de l'acide DNP-aspartique 0.30; R_F de l'acide DNP-glutamique 0.46) (BISERTE ET OSTEUX¹¹).

3. Superpositions des taches de DNP-aminoacides

(i) *Superposition DNP-histidine-DNP-tryptophanne.* Dans le couplage bidimensionnel "toluène + phosphate" la DNP-histidine et le DNP-tryptophanne se placent

au même endroit. Cette concordance ne pose toutefois pas de problèmes particuliers*, car, d'une part, le DNP-tryptophane est détruit au cours de l'hydrolyse acide et d'autre part, la di-DNP-histidine n'accompagne les DNP-aminoacides éthérosolubles que dans le cas d'une extraction couplée éther + acétate d'éthyle.

(ii) *Superposition DNP-sérine-DNP-méthionine-sulfone.* Dans le système "toluène-phosphate 1.5 M", la DNP-sérine et la DNP-méthionine-sulfone se superposent. En fait, la formation de la DNP-méthionine-sulfone aux dépens de la DNP-méthionine n'a lieu qu'au cours de l'extraction des DNP-aminoacides par de l'éther qui n'a pas été privé de peroxydes. Si la présence de DNP-méthionine est soupçonnée, la zone DNP-sérine + DNP-thréonine peut être chromatographiée de nouveau dans le système alcool *tert.*-amylique-phthalate de BLACKBURN ET LOWTHER¹³.

(iii) *Dérivés dinitrophénylés des acides diamminés.* La di-DNP-lysine, la di-DNP-ornithine et l'acide di-DNP-diaminobutyrique ne se séparent pas dans le couplage "toluène-phosphate 1.5 M". Une séparation partielle de la di-DNP-lysine et de la di-DNP-ornithine peut être obtenue en chromatographie avec le système butanol-acide acétique-eau (4:1:5).

L'identification de ces composés est donc délicate. Pour résoudre ce problème (qui peut se poser parfois dans le domaine des polypeptides bactériens), il est donc indispensable de régénérer les acides aminés constitutifs (voir plus loin, paragraphe G, a, 4) et d'identifier ceux-ci, par exemple par une électrophorèse sur papier dans un appareil "en toit" (type Durrum) à pH 3.9 [tampon pyridine-acide acétique-eau (30:100:4870)] pour la séparation de l'acide α,γ -diaminobutyrique du groupe ornithine + lysine, ou à pH 11.7 (ammoniacque N) pour la séparation de la lysine et de l'ornithine.

4. Problème des DNP-leucines

Aucun système solvant ne permet une séparation satisfaisante des DNP-leucines. Au cours de la détermination d'un résidu en position N-terminale, le seul moyen de résoudre la question consiste à régénérer l'acide aminé à partir de son dérivé dinitrophénylé.

La régénération** peut se faire par chauffage dans un tube scellé à 105° pendant 1 h avec de la baryte 0.3 N (MILLS⁵⁸). Ensuite, on élimine la baryte sous forme de carbonate de baryum en faisant passer dans la solution un courant de gaz carbonique. Après évaporation à sec, le résidu est analysé en chromatographie sur papier.

On peut également chauffer les DNP-aminoacides en présence d'ammoniacque (densité 0.880) en tubes scellés à 100° (LOWTHER⁵²).

La séparation chromatographique de la leucine et de l'isoleucine peut être

* La séparation du DNP-tryptophane et de la di-DNP-histidine peut être obtenue dans les systèmes de MELLON: benzène-acide acétique à 1%; *n*-butanol saturé d'eau (voir Tableau IV), et dans le système *sec.*-butanol-tampon phthalate de pH 6 (R_F du DNP-Try = 0.54; R_F de la DNP-His = 0.33). Durée de la chromatographie: 40 h (résultats personnels).

** Ces méthodes de régénération sont valables pour tous les DNP-aminoacides; elles sont utilisables uniquement pour une identification, car les rendements en acides aminés régénérés sont faibles.

obtenue soit dans le système *tert.*-pentanol-eau (WORK⁸⁵), soit dans le système de HÖGSTRÖM⁸⁵, soit dans le mélange *n*-butanol-alcool benzylique-eau (CONSDEN *et al.*²⁰).

5. Produits de décomposition de la DNP-proline

Au cours de l'hydrolyse de la DNP-proline, deux dérivés nouveaux peuvent se former : l'acide δ -chloro- α -DNP-aminovalérique et l'acide α -chloro- δ -DNP-aminovalérique (SCANES ET TOZER⁸¹)*. La destruction de la DNP-proline et l'apparition de ces composés dépendent des conditions d'hydrolyse (voir paragraphe D, c, I, p. 239).

Il est d'ailleurs commode d'identifier la DNP-proline en position N-terminale par l'intermédiaire de ces deux artefacts (PHILLIPS⁶⁴). Leur séparation chromatogra-

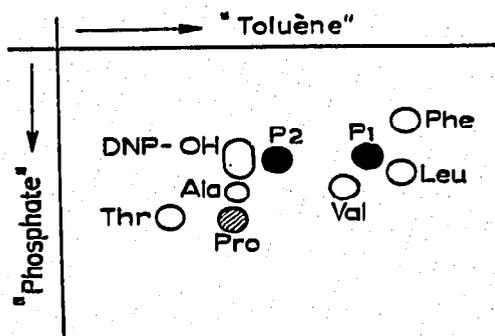


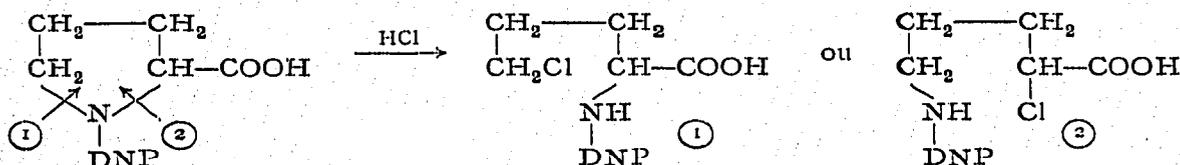
Fig. 8. Étude chromatographique (systèmes solvants "toluène" et "phosphate") des produits de décomposition de la DNP-proline (hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5.6 N à 100-105° pendant 24 h en tube scellé). DNP-proline = surface hachurée; P1 = acide δ -chloro- α -DNP-aminovalérique; P2 = acide α -chloro- δ -DNP-aminovalérique; DNP-OH = dinitrophénol.

phique soit dans le couplage "toluène" et "phosphate" (voir Fig. 8) soit dans le couplage "*sec.*-butanol-phtalate" et "phosphate" (voir Fig. 7) est relativement commode. Il est intéressant de signaler que la DNP-proline prend une coloration rouge après exposition prolongée du chromatogramme à la lumière de Wood.

6. Artefacts chromatographiques de la phase éthérosoluble

Le dinitrophénol et la dinitraniline sont des artefacts habituels de la fraction éthérosoluble. Le dinitrophénol peut être facilement éliminé par sublimation** (voir paragraphe C, c, p. 235). La dinitraniline ne gêne pas la séparation chromatographique, car elle se place loin de tous les autres dérivés dinitrophénylés.

* Sous l'action des agents hydrolysants, il y aurait ouverture du cycle pyrrolidine suivant la réaction:



** Il peut être éliminé également sur colonne d'acide silicique MALLINCKRODT, préparé pour la chromatographie par la méthode de RAMSEY ET PATTERSON (LI ET ASH⁴⁸).

Avec certaines préparations de fluorodinitrobenzène, nous avons parfois constaté la présence d'acide picrique dans une zone voisine de celle qui est occupée par la phénylalanine (voir Fig. 9). L'éluat de la tache donne les réactions caractéristiques et classiques de l'acide picrique.

D'autres artefacts ont également été signalés, notamment par REDFIELD ET ANFINSEN⁷⁰: une tache plus lente que la phénylalanine dans le "toluène" et un peu plus lente que la leucine dans le phosphate; un artefact orangé un peu plus rapide que la glycolle; un autre artefact orangé dans la région de la valine. Enfin, deux produits de décomposition de l' ϵ -DNP-lysine (l'un jaune, l'autre orangé) peuvent se placer dans la zone comprise entre la di-DNP-lysine et la di-DNP-histidine. Ils peuvent être confondus avec la di-DNP-histidine.

b. Hydrolysats enzymatiques de protéines; séparation des DNP-asparagine et DNP-glutamine

Le seul problème particulier posé par l'étude des DNP-aminoacides des hydrolysats enzymatiques de protéines (par exemple: action de la carboxypeptidase ou de la leucine-aminopeptidase) est celui de la séparation de la DNP-asparagine et de la DNP-glutamine.

Dans le couplage "toluène" et "phosphate 1.5 M", ces deux dérivés forment en effet une tache confluyente, mais nettement séparée des autres dérivés dinitrophénylés,

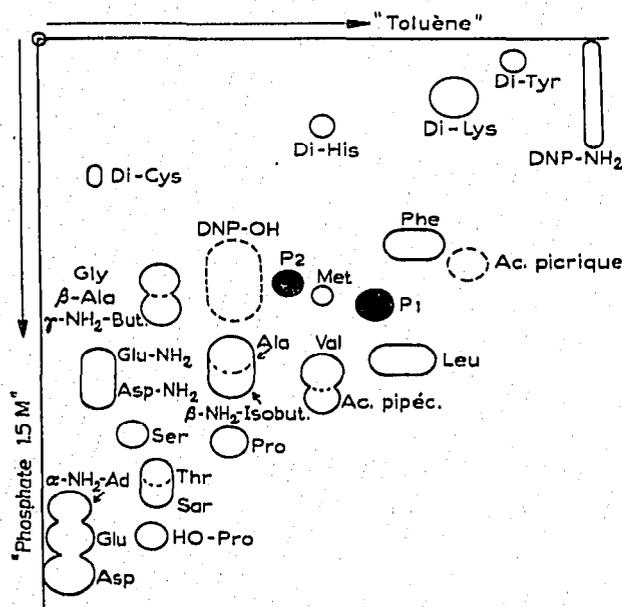


Fig. 9. Chromatographie des DNP-aminoacides éthersolubles décelables après dinitrophénylation d'un milieu biologique. Systèmes solvants "toluène" et "phosphate 1.5 M". α -NH₂-Ad. = acide α -aminoadipique; Sar = sarcosine; β -NH₂-Isobut. = acide β -aminoisobutyrique (T-spot); Ac. pipéc. = acide pipécolique; Asp.-NH₂ = asparagine; Glu-NH₂ = glutamine; β -Ala = β -alanine; γ -NH₂-But. = acide γ -aminobutyrique; P1 et P2 = produits de décomposition de la proline (voir Fig. 8).

Bibliographie p. 269/271.

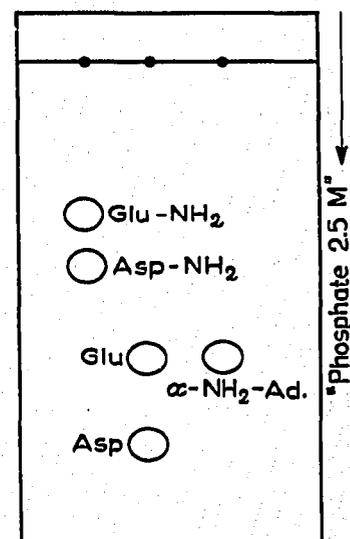


Fig. 10. Séparation des DNP-aminoacides dicarboxyliques et de leurs amides par le système solvant "phosphate 2.5 M". Glu-NH₂ = glutamine; Asp-NH₂ = asparagine; α -NH₂-Ad. = acide α -aminoadipique.

entre le DNP-glycocolle et le groupe DNP-sérine-DNP-thréonine (Fig. 9). Après élution de cette zone, suivant les modalités techniques décrites plus haut (paragraphe G, a, 1, p. 251), la DNP-glutamine et la DNP-asparagine sont facilement séparées en chromatographie unidimensionnelle dans le tampon phosphate 2.5 M (Fig. 10). La glutamine se place derrière l'asparagine.

c. Milieux biologiques complexes

La dinitrophénylation de la fraction "aminoacides" d'un milieu biologique complexe (sang, urine, tissus) conduit à la formation de nombreux dérivés dinitrophénylés éthérosolubles nouveaux, qui viennent le plus souvent se placer au niveau des DNP-aminoacides habituels sur les chromatogrammes "toluène-phosphate 1.5 M" (Fig. 9).

L'acide α -DNP-aminoadipique ne peut être séparé de l'acide DNP-glutamique, même avec un tampon phosphate 2.5 M de pH 6 (Fig. 10).

La DNP-sarcosine se place au niveau de la DNP-thréonine. Elle peut en être distinguée, après élution de leur tache commune, dans le système butanol-acide acétique-eau (4:1:5), l'identification se faisant à l'aide de témoins latéraux: la DNP-sarcosine se place derrière la DNP-thréonine.

La DNP- β -alanine et l'acide γ -DNP-aminobutyrique forment une tache confluyente placée sous celle du DNP-glycocolle. Après élution de l'ensemble de la zone, la séparation peut être faite, en s'aidant de témoins latéraux, en électrophorèse sur papier à pH 3.9 (tampon pyridine-acide acétique-eau (30:100:4870)) sous 300 V pendant 4 h dans un appareil "en toit" (type Durrum). L'ordre croissant de migration vers l'anode est le suivant: acide γ -DNP-aminobutyrique, DNP- β -alanine, DNP-glycocolle. L'utilisation du système *sec.*-butanol-tampon phtalate de pH 6 permet la séparation DNP-glycocolle ($R_F = 0.29$), DNP-alanine ($R_F = 0.43$), DNP- β -alanine ($R_F = 0.52$) (durée de la chromatographie: 40 h) (résultats personnels). Les R_F de l'acide γ -DNP-aminobutyrique dans différents systèmes solvants sont les suivants (KOJIMA *et al.*⁴⁰): *n*-butanol saturé avec de l'ammoniaque: 0.40; *n*-butanol-eau-éthanol (4:2:1): 0.90; *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5): 0.95; tampon phosphate 0.1 M: 0.66.

L'acide β -DNP-amino-isobutyrique (*T-spot*) coïncide avec la tache de la DNP-alanine. Après élution de cette zone, l'identification de ces deux composés peut se faire, en présence de témoins latéraux, en chromatographie unidimensionnelle dans le butanol-acide acétique-eau (4:1:5). L'alanine se place derrière l'acide β -DNP-amino-isobutyrique.

L'acide DNP-pipécolique ne se sépare pas de la DNP-valine en chromatographie bidimensionnelle. Après élution de cette zone, l'identification de ces composés peut se faire à l'aide de témoins latéraux en électrophorèse sur papier en tampon acide acétique N de pH 2.4 sous 300 V pendant 5 h dans un appareil "en toit" (type Durrum). La DNP-valine migre plus rapidement que l'acide DNP-pipécolique.

Toutes ces identifications sont longues et délicates. Il est indispensable qu'elles soient toujours effectuées en présence des DNP-aminoacides correspondants placés en témoins internes et latéraux.

H. CHROMATOGRAPHIE DES DNP-AMINOACIDES HYDROSOLUBLES

La séparation des DNP-aminoacides hydrosolubles dépend directement des applications particulières de la méthode des DNP-aminoacides.

*a. DNP-aminoacides hydrosolubles d'un hydrolysats total de protéine**i. Dinitrophénylation en milieu hydro-alcoolique (voir paragraphe C, b, 2, p. 234)*

Les DNP-aminoacides non éthérosolubles du milieu sont l' α -mono-DNP-arginine et la di-DNP-histidine. La di-DNP-histidine peut être extraite par l'acétate d'éthyle. On peut donc être amené soit à séparer l' α -mono-DNP-arginine et la di-DNP-histidine, soit à chromatographier l' α -mono-DNP-arginine seule. Ce problème peut être facilement résolu par une chromatographie unidimensionnelle dans le système "toluène" (voir Fig. 11). Malgré la simplicité apparente de la question, de nombreuses difficultés techniques peuvent se présenter au cours de sa résolution. La variabilité des R_F de ces composés, la présence d'artefacts colorés sont les principales causes d'erreur. Il est donc indispensable d'effectuer la chromatographie unidimensionnelle sur une feuille de papier Whatman No. 1 distincte et non pas, comme l'avait indiqué LEVY⁴³, sur le chromatogramme qui est utilisé pour la séparation des DNP-aminoacides

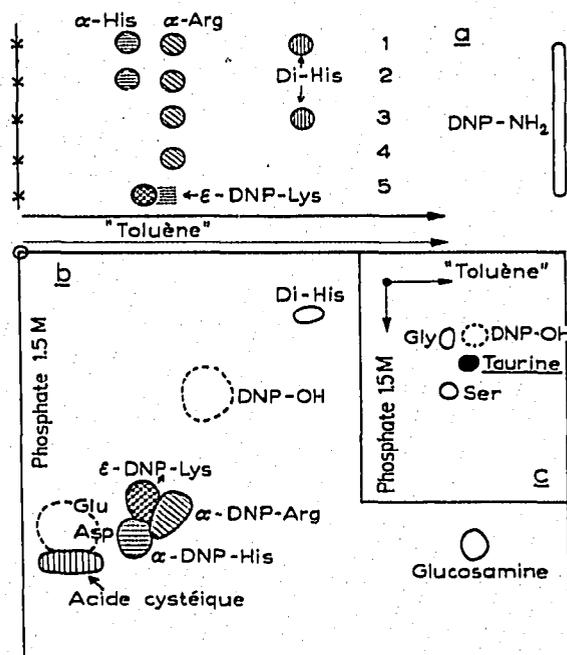


Fig. 11. Chromatographie sur papier des DNP-aminoacides hydrosolubles. (a) Chromatographie unidimensionnelle des DNP-aminoacides hydrosolubles (système solvant "toluène"). 1 = mélange des dérivés témoins; 2 = hydrolysats total après dinitrophénylation en milieu aqueux (technique de LEVY, paragraphe C, b, 1, p. 232); 3 = hydrolysats total après dinitrophénylation en milieu hydro-alcoolique (paragraphe C, b, 2, p. 234); 4 = hydrolysats total après extraction de la di-DNP-histidine par l'acétate d'éthyle (voir Tableau II); 5 = présence d' ϵ -DNP-lysine (et éventuellement d'autres dérivés dinitrophénylés hydrosolubles) après hydrolyse totale d'une DNP-protéine. (b) Carte chromatographique bidimensionnelle ("toluène" et "phosphate 1.5 M") de dérivés dinitrophénylés hydrosolubles. (c) Position de la DNP-taurine (hydrosoluble) sur la carte chromatographique "toluène" et "phosphate 1.5 M".

éthérosolubles (les deux dépôts de substances éthéro- et hydrosoluble se faisant aux deux extrémités de la feuille, la bandelette contenant les DNP-aminoacides hydrosolubles étant découpée ensuite avant la mise en route de la deuxième dimension dans le phosphate 1,5 M).

Sur cette feuille séparée, il est également indispensable de placer des témoins latéraux et internes d' α -mono-DNP-arginine et de di-DNP-histidine et d'effectuer sur le papier une révélation de Sakaguchi*, réaction qui donne une coloration rouge orangé avec l' α -mono-DNP-arginine.

2. *Dinitrophénylation en milieu aqueux* (technique de LEVY; voir paragraphe C, b, 1, p. 232)

Dans ces conditions, les DNP-aminoacides hydrosolubles peuvent être l' α -mono-DNP-arginine et l' α -mono-DNP-histidine, celle-ci n'étant pas extractible par l'acétate d'éthyle. La séparation peut s'effectuer également en chromatographie unidimensionnelle dans le système "toluène" sur une feuille distincte, en présence de témoins latéraux et internes. Enfin, il est indispensable de vérifier la nature des dérivés dinitrophénylés par la réaction de Sakaguchi pour l' α -mono-DNP-arginine et par la réaction de Pauly** pour l' α -mono-DNP-histidine.

b. *DNP-aminoacides hydrosolubles d'un hydrolysate de DNP-protéine ou de DNP-peptide*

(Problème de l'identification d'un résidu d'acide aminé en position terminale)

1. *Protéine*

Dans le cas d'une protéine, l'histidine et l'arginine en position N-terminale peuvent donner des dérivés hydrosolubles, la di-DNP-histidine (réaction de Pauly négative) et éventuellement l' α -mono-DNP-histidine (réaction de Pauly positive), et l' α -mono-DNP-arginine (réaction de Sakaguchi positive). Dans le cas d'une protéine oxydée, la cystine éventuellement en position terminale est oxydée en acide cystéique et la phase hydrosoluble de l'hydrolysate de la DNP-protéine oxydée peut également contenir de l'acide DNP-cystéique.

Mais l'hydrolysate contient obligatoirement d'autres dérivés dinitrophénylés: l' ϵ -DNP-lysine (composé jaune, donnant une réaction brune à la ninhydrine), l'imidazole-DNP-histidine (composé peu coloré, donnant une réaction brune à la ninhydrine et présentant une fluorescence sombre en lumière de Wood, ne donnant

* *Technique de la réaction de Sakaguchi recommandée*: pulvériser le chromatogramme avec une solution de 8-hydroxyquinoléine à 0,1% dans l'acétone; après séchage, pulvériser une solution d'hypobromite de sodium préparée extemporanément en dissolvant 0,2 ml de brome dans 100 ml de soude 0,5 N; les taches de DNP-arginine virent au rouge rosé.

** *Technique de la réaction de Pauly recommandée*: pulvériser le chromatogramme avec le mélange à parties égales des deux réactifs suivants: *réactif a*: *p*-anisidine 1 g, acide chlorhydrique pur 1 ml, éthanol absolu 100 ml; *réactif b*: nitrite d'amyle 10 g, éthanol absolu q.s.p. 100 ml; attendre 3 à 5 min le séchage du papier à la température du laboratoire, puis pulvériser une solution de potasse à 1% dans l'éthanol; l' α -mono-DNP-histidine et l'histidine donnent des taches rouge brique sur un fond jaune orangé.

pas la réaction de Pauly), l'O-DNP-tyrosine (composé incolore, donnant une réaction violette à la ninhydrine, présentant une fluorescence sombre en lumière de Wood). Éventuellement, on peut trouver également de la S-DNP-cystéine.

Le problème à résoudre peut donc être relativement complexe, d'autant plus que les quantités d' ϵ -mono-DNP-lysine sont toujours importantes par rapport aux quantités de dérivés dinitrophénylés pouvant provenir d'un résidu en position N-terminale.

La question peut être abordée de plusieurs façons. On peut essayer de séparer l'ensemble des composés par une technique chromatographique. Il est possible également de simplifier le mélange avant de le soumettre à la chromatographie.

(i) *Séparations chromatographiques des dérivés dinitrophénylés hydrosolubles.* Les systèmes solvants préconisés peuvent être soit ceux de la chromatographie classique

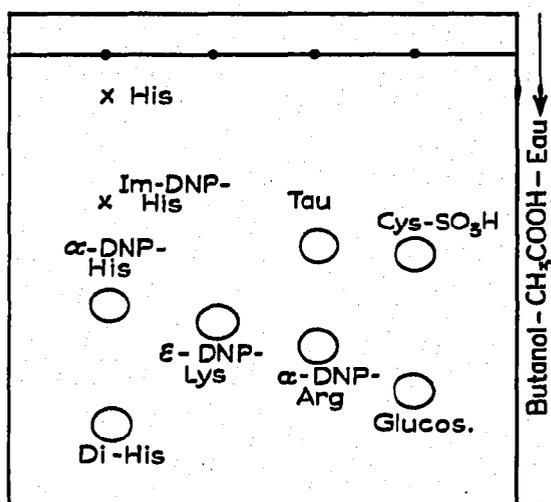


Fig. 12. Chromatographie sur papier des DNP-aminoacides hydrosolubles. Système solvant: butanol-acide acétique-eau (4:1:5). Les croix indiquent l'emplacement de l'histidine libre (His) et de l'imidazole-DNP-histidine (Im-DNP-His), composé très faiblement coloré en jaune. Cys-SO₃H = acide DNP-cystéique.

des acides aminés, soit ceux de la chromatographie des dérivés dinitrophénylés éthérosolubles.

Les systèmes *butanoliques acides* peuvent être employés avec profit: système butanol-acide acétique-eau (4:1:5) de PARTRIDGE, préparé 24 heures avant son usage (SANGER ET TUPPY⁸⁰) (voir Tableaux VI et VII et Fig. 12); système *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1) (INGRAM ET SALTON⁸⁶) en chromatographie ascendante*; système *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10) (MARGOLIASH⁸⁴, ACHER¹) (voir Tableau VII). Dans le système butanol-acide acétique-eau (250:60:250 v/v) de WOJWOD⁸³, la δ -mono-DNP-ornithine migre moins vite que l' ϵ -mono-DNP-lysine

* Ce système permet de séparer l' ϵ -mono-DNP-lysine et l'acide mono-DNP-diaminopimélique. Ces deux dérivés peuvent également être séparés en électrophorèse sur papier Whatman No. 3 MM en tampon de pH 6.4 (pyridine-acide acétique-eau: 10:0.4:90) sous 20 V/cm pendant 1 h (INGRAM ET SALTON⁸⁶).

(NEWTON ET ABRAHAM⁶²). La variabilité des R_F suivant les conditions expérimentales oblige à l'utilisation de témoins internes latéraux et de colorations spécifiques (réactions de Pauly et de Sakaguchi).

TABLEAU VI

 R_F DES DÉRIVÉS DINITROPHÉNYLÉS HYDROSOLUBLES

Papier Whatman No. 4; solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5) préparé 24 h avant usage.

	R_F	Couleur des taches	Réaction à la ninhydrine	U.V.
O-DNP-tyrosine	0.84	incoloré	violet	sombre
α -DNP-arginine	0.81	jaune	pas de réaction	
ϵ -DNP-lysine	0.77	jaune	brun	
Leucine*	0.67	—	—	
Imidazole-DNP-histidine	0.57	(?)	brun	sombre
Valine*	0.49	—	—	
Acide DNP-cystéique	0.42	jaune	—	

* Les R_F de ces acides aminés sont donnés à titre de comparaison.

TABLEAU VII

 R_F DES DÉRIVÉS DINITROPHÉNYLÉS HYDROSOLUBLES DANS QUELQUES SYSTÈMES SOLVANTS

	Butanol-acide formique		Butanol-acide acétique		Phénol (NH ₃)
	MARGOLIASH ⁶⁴	ACHER ¹	SANGER ET TUPPY ⁴⁰	Résultats personnels	
Histidine	0.02			0.09	
α -DNP-histidine	0.09			0.57	
Imidazole-DNP-histidine	0.16	0.24	0.57	0.33	
Di-DNP-histidine	0.63	0.75		0.83	0.87
ϵ -DNP-lysine		0.56	0.77	0.60	0.90
α -DNP-arginine		0.65	0.81	0.65	0.93
Acide DNP-cystéique*			0.42	0.45	0.24
Taurine				0.43	

* L'acide DNP-cystéique n'est pas adsorbé sur les colonnes de talc comme les autres dérivés dinitrophénylés hydrosolubles (voir paragraphe D, d, 1, p. 242).

Les systèmes *phénoliques* peuvent également être essayés, notamment le phénol saturé d'eau en atmosphère d'ammoniaque à 3% (v/v) et d'acide cyanhydrique (voir Tableau VII), qui permet une séparation satisfaisante de l'acide DNP-cystéique de l'ensemble des autres dérivés dinitrophénylés hydrosolubles. En chromatographie bidimensionnelle [butanol-acide acétique-eau (4:1:5) en première dimension et phénol (NH₃ 3%) ou *m*-crésol-phénol-tampon borate de pH 9.3 (25:25:7)* en seconde dimension] l'acide DNP-cystéique est nettement séparé.

* Tampon borate: 200 ml d'acide borique 0.1 N et 113.5 ml de NaOH 0.1 N. Le tampon est pulvérisé également sur le papier avant la mise en route de la seconde dimension, sauf dans la zone du chromatogramme où se trouvent les acides aminés séparés par la première dimension (LEVY ET CHUNG⁴⁴). Dans la carte chromatographique des acides aminés et des DNP-aminoacides hydrosolubles donnée par FRAENKEL-CONRAT, HARRIS ET LEVY²⁸, la position de la di-DNP-histidine est inexacte (voir Fig. 12).

Bibliographie p. 269/271.

Les systèmes solvants décrits pour les dérivés dinitrophénylés éthersolubles peuvent être aussi employés, notamment le système alcool *tert.*-amylique-tampon phtalate de pH 6 de BLACKBURN ET LOWTHER (voir Fig. 13) ou le système "toluène" de BISERTE ET OSTEUX (voir Fig. 11).

La chromatographie bidimensionnelle "toluène-phosphate 1.5 M" a également été préconisée. Mais le résultat n'est pas très satisfaisant; la séparation de l'arginine et de l' ϵ -mono-DNP-lysine n'est pas très poussée* et ce couplage ne donne pas de meilleurs résultats que la chromatographie unidimensionnelle.

L'électrophorèse sur papier peut aussi résoudre facilement quelques problèmes. Par exemple, la séparation de l' α -DNP-arginine et de l' ϵ -DNP-lysine peut être

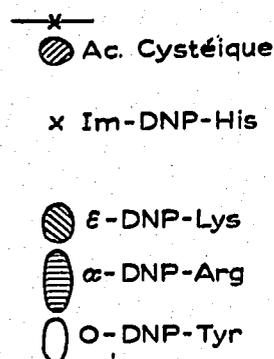


Fig. 13. Chromatographie des DNP-aminoacides hydrosolubles. Système solvant alcool-*tert.*-amylique-phtalate de BLACKBURN ET LOWTHER (d'après FRAENKEL-CONRAT, HARRIS ET LEVY²⁸).

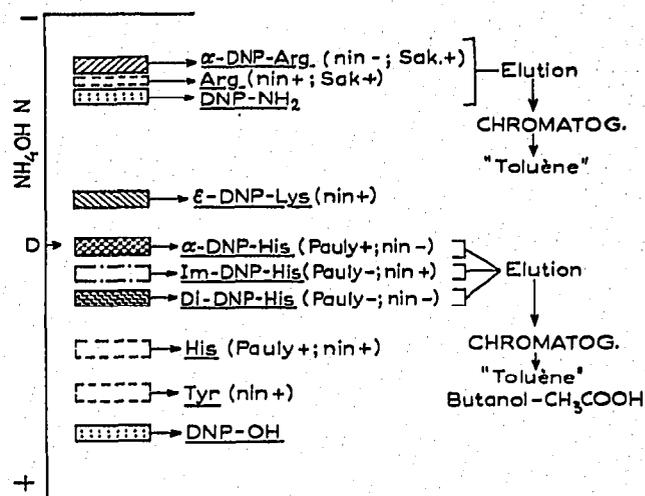


Fig. 14. Séparation électrophorétique des DNP-aminoacides hydrosolubles. Papier Whatman No. 1 ou No. 3; tampon $\text{NH}_4\text{OH } N$; appareil d'électrophorèse "en toit" type Durrum. D = point de départ de l'électrophorèse; nin = réaction à la ninhydrine; Sak = réaction de Sakaguchi; Pauly = réaction de Pauly; DNP-OH = dinitrophénol; DNP-NH₂ = dinitraniline. Les taches

entourées par des traits pointillés ne sont pas jaunes à l'examen direct. Après élution des diverses taches séparées en électrophorèse, les éluats sont étudiés en chromatographie unidimensionnelle.

réalisée en électrophorèse sur papier en milieu ammoniacal N dans un appareil "en toit" (type Durrum) (voir Fig. 14). De même, la séparation de l'acide DNP-cystéique et de l' ϵ -mono-DNP-lysine, extraits de l'hydrolysate par le *n*-butanol, peut être obtenue en électrophorèse sur papier Whatman No. 3 imbibé par un tampon phosphate 0.1 M à pH 7.0 (ANFENSEN, SELA ET TRITCH³).

(ii) *Simplification du mélange des dérivés dinitrophénylés hydrosolubles avant l'étude chromatographique.*

(α) *Cas de l' α -DNP-arginine.* On peut éliminer les acides aminés de l'hydrolysate (tous les acides aminés constitutifs, plus quelques molécules de lysine ou d'histidine

* La carte chromatographique publiée par DAVIES ET HARRIS²² est incomplète et partiellement inexacte.

non réactives et non dinitrophénylées) sur une colonne de talc (SANGER, voir paragraphe D, d, 1, p. 241). L'éluat de la colonne de talc, qui contient les dérivés dinitrophénylés hydrosolubles, est traité par le fluorodinitrobenzène (ROVERY, FABRE ET DESNUELLE⁷⁵). Dans ces conditions, l' ϵ -mono-DNP-lysine devient de la di-DNP-lysine, l'O-DNP-tyrosine de la di-DNP-tyrosine, l'imidazole-DNP-histidine de la di-DNP-histidine, tandis que le dérivé dinitrophénylé de l'arginine (α -mono-DNP-arginine) n'est pas modifié. Après cette seconde dinitrophénylation, l'extraction étherée du résidu enlève la di-DNP-lysine et la di-DNP-tyrosine, tandis que la phase aqueuse contient de la di-DNP-histidine et l' α -mono-DNP-arginine provenant d'un acide aminé terminal de la chaîne peptidique. La phase aqueuse est chromatographiée dans le système butanol-acide acétique-eau (4:1:5) (voir plus haut) et l'identification certaine de l' α -mono-DNP-arginine est obtenue au moyen de la réaction de Sakaguchi.

Un autre mode opératoire a également été proposé par BAILEY⁴. L' ϵ -mono-DNP-lysine est transformée ici en ϵ -mono-DNP- α -méthoxycarbonyllysine (ϵ -DNP- α -MC-lysine) qui est éthérosoluble. Le mode opératoire est le suivant. Après extraction des DNP-aminoacides éthérosolubles, la phase aqueuse (équivalente à 0.2 g de protéine) est évaporée à siccité, dissoute dans l'acide chlorhydrique 0.1 N et passée sur une colonne de talc (voir BAILEY ET BETTELHEIM⁵ et paragraphe D, d, 1, p. 242). Les aminoacides hydrosolubles sont élués à l'éthanol chlorhydrique (éthanol: 4 vol.; HCl N: 1 vol.). Ils sont dissous dans 2-3 ml d'un mélange bicarbonate-carbonate de pH 8.9 (mélange de 20 ml de bicarbonate de sodium à 10% et de 5 ml de carbonate de sodium à 10%). A la solution portée à 20°, on ajoute à quatre reprises 0.02 ml de chlorure de méthoxycarbonyl à des intervalles de 10 min et sous une agitation vigoureuse. Le mélange est acidifié avec de l'acide chlorhydrique, extrait 4 fois à l'éther pour éliminer l' ϵ -DNP- α -MC-lysine. La phase aqueuse est chromatographiée comme précédemment.

(β) *Cas des dérivés de l'histidine.* Pour résoudre ce problème, il est impossible d'utiliser la technique décrite dans le cas de l' α -DNP-arginine, parce que, au cours de la seconde dinitrophénylation, tous les dérivés de l'histidine, en position intrapeptidique ou terminale, peuvent être transformés en di-DNP-histidine.

Pour aborder cette question très délicate, on peut avoir recours aux extractions sélectives, comme l'extraction étherée continue du résidu aqueux suivant les modalités décrites et avec l'appareillage préconisé par MILLS⁵⁸, ou à l'extraction à l'acétate d'éthyle.

L'utilisation de la chromatographie unidimensionnelle en présence de témoins internes et latéraux, avec mise en œuvre de colorations spécifiques (réactions de Pauly, ninhydrine), constitue l'étape ultime de l'identification, qui n'est pas toujours couronnée de succès.

En conclusion, l'identification des dérivés dinitrophénylés hydrosolubles dérivant d'acides aminés en position N-terminale est toujours délicate et, avant de conclure à leur existence, il est indispensable de s'entourer de garanties nombreuses et indiscutables. Il faut employer plusieurs systèmes solvants et réaliser une électrophorèse sur papier (Fig. 14).

(iii) *Artefacts de la fraction hydrosoluble.* Un certain nombre d'artefacts peuvent être trouvés dans la fraction hydrosoluble.

BAILEY⁴, notamment, a signalé la présence d'une impureté de couleur brune qui peut être facilement séparée de l' α -mono-DNP-arginine (si celle-ci est présente) par passage sur une petite colonne de silice acide éluée par de la méthyléthylcétone (SANGER⁷⁶).

Nous avons également trouvé assez souvent sur les chromatogrammes des taches colorées en jaune, de nature inconnue. C'est pour cette raison qu'il est absolument indispensable d'utiliser des témoins latéraux et internes et des réactions de coloration spécifiques pour localiser les DNP-aminoacides hydrosolubles.

Signalons également un artefact qui peut gêner l'identification de l'acide DNP-cystéique*. En chromatographie bidimensionnelle butanol-acide acétique et phénol aqueux, les R_F de ces deux composés sont les suivants, d'après THOMPSON⁸⁸:

	R_F artefact	R_F acide DNP-cystéique
Butanol-acide acétique	0.29	0.18
Phénol	0.58	0.38

2. Problèmes particuliers de séparation

(i) *Séparation des dérivés monodinitrophénylés des acides diamminés.* Dans la chimie des polypeptides bactériens, on peut trouver non seulement de la lysine, mais aussi de l'ornithine et de l'acide α, γ -diaminobutyrique. La séparation des dérivés dinitrophénylés de ces acides diamminés est très délicate: nous avons signalé plus haut l'impossibilité de séparer les dérivés dinitrophénylés éthérosolubles de la lysine, de l'ornithine et de l'acide α, γ -diaminobutyrique. La séparation des dérivés monodinitrophénylés soit en position α , soit en position ε , est également très difficile. Le procédé proposé par NEWTON ET ABRAHAM⁹² pour la séparation de l' ε -mono-DNP-lysine et de la δ -mono-DNP-ornithine dans le butanol-acide acétique-eau (250:60:250) est peu efficace, même en présence de témoins latéraux.

Des résultats plus satisfaisants peuvent être obtenus en électrophorèse sur papier.

(α) *Séparation de l' ε -mono-DNP-lysine, de la δ -DNP-ornithine et de l'acide γ -mono-DNP-diaminobutyrique.* Électrophorèse en tampon borate 0.02 M de pH 9.1 (LOCKHART ET ABRAHAM⁵⁰) sur papier Arches 304 ou Whatman No. 3, dans un appareil "en toit" (type Durrum); 10 V/cm pendant 17 heures (voir Fig. 15a).

(β) *Séparation de l' α -mono-DNP-lysine, de l' α -mono-DNP-ornithine et de l'acide α -mono-DNP-diaminobutyrique.* Électrophorèse en milieu ammoniacal N sur papier Whatman No. 3 dans un appareil "en toit" (type Durrum); 8-9 V/cm pendant 16 heures (voir Fig. 15b). Cette électrophorèse ne sépare pas l'acide α -mono-DNP-diaminobutyrique de l'acide γ -mono-DNP-diaminobutyrique, ni l' α -mono-DNP-ornithine de la δ -mono-DNP-ornithine. L' ε -mono-DNP-lysine se confond avec l' α -mono-DNP-ornithine.

Le couplage de 2 électrophorèses unidimensionnelles, l'une en milieu NH_4OH N et l'autre ensuite, après élution, en tampon borate 0.02 M de pH 9.1, permet de résoudre tous ces problèmes.

* Ce problème s'est posé récemment au sujet des acides aminés terminaux de la sérualbumine. THOMPSON a démontré que la substance identifiée par TITANI *et al.*⁸⁹ était un artefact.

(γ) Séparation des dérivés monodinitrophénylés en position α ou ω . Les systèmes solvants chromatographiques ne permettent pas la résolution de ces différents composés. La séparation des dérivés d'une même série: α -mono-DNP-lysine et ε -mono-DNP-lysine; α -mono-DNP-ornithine et δ -mono-DNP-ornithine; acide α -mono-DNP-diaminobutyrique et acide γ -mono-DNP-diaminobutyrique, est facilement obtenue

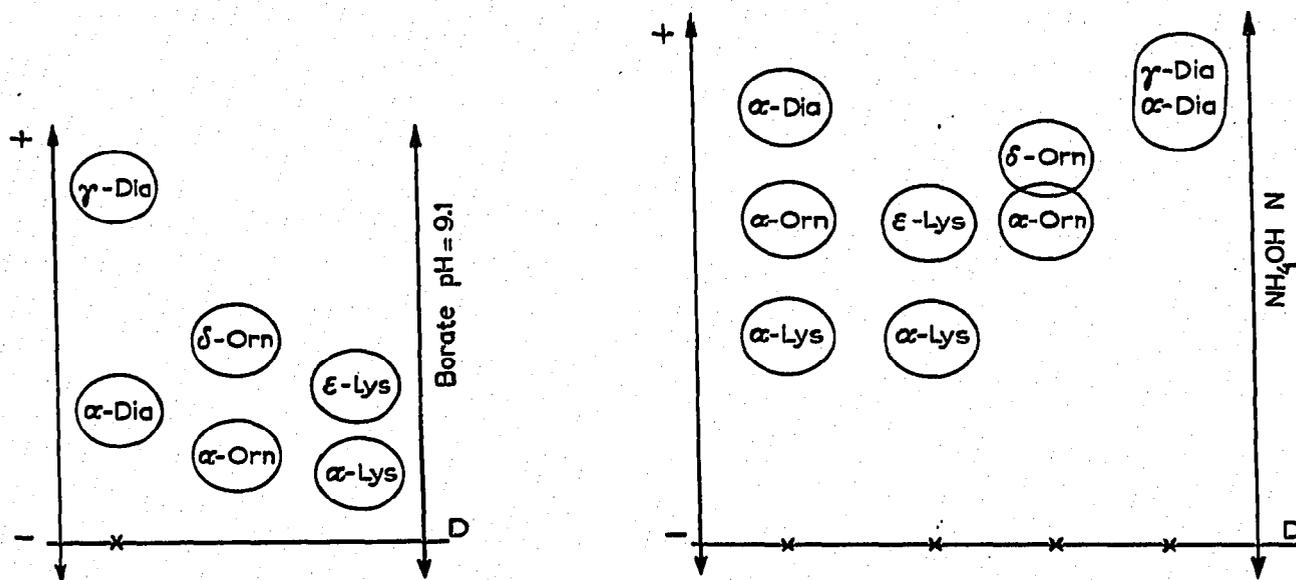


Fig. 15. (a) Électrophorèse sur papier des dérivés dinitrophénylés d'acides diaminés. Électrophorèse "en toit" type Durrum; tampon borate 0.02 M de pH 9.1; papier Arches 304 ou Whatman No. 3; 10 V/cm; 17 h. Distance parcourue par l'acide α -DNP-diaminobutyrique = 6 cm; par l'acide γ -DNP-diaminobutyrique = 16 cm. (b) Électrophorèse sur papier des dérivés dinitrophénylés des acides diaminés. Électrophorèse "en toit" type Durrum; papier Whatman No. 3; tampon NH_4OH N; 8-9 V/cm; 16 h. Distance parcourue par l' α -DNP-lysine = 5 cm.

en électrophorèse sur papier dans le tampon borate 0.02 M (pH 9.1) (voir Fig. 15a).

(ii) Séparation de la DNP-glucosamine et de la DNP-chondrosamine. Ces deux dérivés peuvent être séparés facilement dans le système solvant butanol-éthanol-eau (4:1:5) sur papier Whatman No. 1. Les R_F de ces substances sont respectivement: DNP-glucosamine 0.75; DNP-chondrosamine 0.61 (KENT *et al.*³⁸).

Sur le chromatogramme bidimensionnel "toluène-phosphate 1.5 M", la DNP-glucosamine est très nettement séparée de tous les autres dérivés (voir Fig. 11).

(iii) DNP-aurine. Elle peut être également chromatographiée dans le système butanol-acide acétique et dans le système "toluène" (voir Fig. 11).

I. CHROMATOGRAPHIE DES DNP-PEPTIDES

La chromatographie des DNP-peptides pose des problèmes très particuliers et il est difficile de présenter un plan précis de séparation valable dans tous les cas*.

* THOMPSON⁸⁰ et MCFADDEN ET SMITH⁸³ ont proposé des plans de fractionnement sur des colonnes de Celite tamponnée. La distribution à contre-courant peut également donner des résultats très satisfaisants (BATTERSBY ET CRAIG⁶, REDFIELD ET ANFINSEN⁷⁰).

Les DNP-peptides proviennent le plus souvent d'un hydrolysats partiel acide ou enzymatique d'une DNP-protéine. L'hydrolysats partiel peut être extrait successivement à l'éther sulfurique (3 fois), à l'acétate d'éthyle (3 fois), au *n*-butanol (1 fois). La phase aqueuse résiduelle peut contenir encore des peptides dinitrophénylés (LI *et al.*⁴⁹).

Le comportement des DNP-oligopeptides se rapproche dans une certaine mesure de celui des DNP-aminoacides. D'autre part, la séparation des DNP-peptides est assez rapidement limitée par leur insolubilité dans les solvants organiques ou dans les milieux aqueux acides ou alcalins. On pourra donc essayer tous les systèmes solvants décrits pour les acides aminés.

Le système solvant suivant a également été employé, sur papier Whatman No. 3: *sec.*-butanol-*tert.*-butanol-2,4,6-collidine-ammoniaque-acide acétique glacial-eau (60:20:20:2:0.25:100 vol./vol.) (REDFIELD ET ANFINSEN⁷⁰).

Des couplages intéressants ont été proposés par COLE, LI, HARRIS ET PON¹⁹ et par LI, COLE, CHUNG ET LEONIS⁴⁹.

1. DNP-peptides éthérosolubles

Séparations unidimensionnelles dans les systèmes alcool *tert.*-amylique-alcool isoamylique-NH₄OH aqueuse 3% (1:1:2); alcool *tert.*-amylique-NH₄OH aqueuse 3% (1:1); alcool *tert.*-amylique-alcool isoamylique-NH₄OH aqueuse 3% (2:1:3).

2. DNP-peptides solubles dans l'acétate d'éthyle

Chromatographie bidimensionnelle avec l'alcool *tert.*-amylique-NH₄OH aqueuse 3% (1:1) en première dimension et un tampon phosphate 0.8 M de pH 6.7 en seconde dimension; ou chromatographie unidimensionnelle dans le système alcool *tert.*-amylique-alcool isoamylique-ammoniaque 3% (2:1:3).

3. DNP-peptides solubles dans le *n*-butanol et dans la phase aqueuse

Chromatographies unidimensionnelles dans le système alcool *tert.*-amylique-alcool isoamylique-ammoniaque 3% (2:1:3) et phosphate 1.6 M de pH 7.

Il faut également signaler les possibilités séparatives offertes par l'électrophorèse sur papier, notamment en tampon saturé d'urée, qui diminue l'adsorption des DNP-peptides sur le papier (solution 8 M en urée et tampon acétate-collidine 0.04 M de pH 7.9) (REDFIELD ET ANFINSEN⁷⁰). Les électrophorèses à haut potentiel sont conduites sous 800 V sur papier Whatman No. 3 sous toluène (MICHL⁵⁶).

J. CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES DNP-AMINOACIDES

La chromatographie des DNP-aminoacides peut être facilement rendue quantitative. Après élution de la tache, l'éluat est dosé directement par spectrophotométrie.

a. Dosage des acides aminés d'un hydrolysats
(méthode de LEVY⁴³)

1. *Élution des taches*

Pour l'hydrolyse et la formation des DNP-aminoacides, voir paragraphes C, a et C, b, pp. 232 *et seq.*). Après la chromatographie des DNP-aminoacides éthersolubles (chromatogramme bidimensionnel réalisé à partir des DNP-aminoacides correspondant à 0.1–0.2 mg de protéine) et hydrosolubles (chromatogramme unidimensionnel réalisé à partir des DNP-aminoacides correspondant à 0.2–0.4 mg de protéine) (voir pp. 246, 256), les taches sont soigneusement découpées et les surfaces de papier correspondantes sont placées dans des petits tubes à centrifuger avec 4 ml de bicarbonate de sodium à 1%. Les tubes sont chauffés à 50–55° dans un bain-marie pendant 20 min pour parfaire l'éluion, puis secoués et centrifugés. Trois surfaces de papier servant de "blancs" (3 × 4 cm) sont également découpées dans le chromatogramme, dans des régions voisines de la DNP-leucine et des acides DNP-dicarboxyliques et au-dessus du dinitrophénol. Après refroidissement, l'éluat est versé dans une cuve de quartz de 1 cm d'épaisseur.

2. *Dosage*

La densité optique est lue au spectrophotomètre à 360 m μ (sauf pour la proline et l'hydroxyproline où la lecture se fait à 385 m μ , pour les DNP-peptides à 350 m μ et pour l' ϵ -mono-DNP-lysine à 390 m μ), contre un blanc contenant de l'eau.

Les densités optiques des tubes contenant les "blancs papier" sont également mesurées: les résultats sont de l'ordre de 0.001–0.002 par cm². Les corrections appropriées sont faites pour chaque tache d'après sa surface. La densité optique de la tache "acide aspartique + acide glutamique" est mesurée dans sa totalité.

A partir d'un second chromatogramme effectué avec le couplage "toluène-phosphate 2.5 M", on peut déterminer les proportions d'acide glutamique et d'acide aspartique.

3. *Expression des résultats*

Les récupérations en quantités absolues varient d'un chromatogramme à l'autre. Les résultats sont donc exprimés sur une base commune en fractions molaires.

Afin de convertir les densités optiques en rapports molaires, on les multiplie par les facteurs de LEVY (voir Tableau VIII)* qui, étant donnée la précision de la méthode ($\pm 4\%$), sont indépendants de la composition du mélange analysé.

* Les facteurs de LEVY ont été déterminés par cet auteur pour les hydrolysats d'insuline. Ils ne sont pas obligatoirement entièrement valables pour les autres protéines. BROMER *et al.*¹⁷, par exemple, ont calculé de nouveaux facteurs pour le glucagon. En première approximation, ils appliquent à l'hydrolysats protéique les facteurs de LEVY. A partir des données quantitatives ainsi obtenues, ils préparent un mélange d'acides aminés qui ressemble au glucagon, ils le soumettent aux opérations d'hydrolyse et le traitent comme un hydrolysats protéique. De cette façon, de nouveaux facteurs de destruction peuvent être calculés. Cette opération est répétée plusieurs fois pour obtenir une plus grande précision des facteurs de correction. Dans l'ensemble, les facteurs de BROMER sont plus élevés (17% environ) que ceux de LEVY. Notamment, l'histidine et la méthionine subissent des pertes plus grandes que celles signalées par LEVY.

TABLEAU VIII

FACTEURS DE CORRECTION UTILISÉS AU COURS DU DOSAGE DES DNP-AMINOACIDES

	<i>Facteurs de LEVY¹⁵</i>	<i>Facteurs de BROMER¹⁷</i>
Glycocolle	1.03	1.33
Sérine	0.97	1.32
Thréonine	1.02	1.22
Proline	0.93	—
Alanine	1.09	1.28
Méthionine	1.21	2.12
Valine	0.99	1.20
Leucine	1.10	—
Phénylalanine	1.03	1.20
Lysine	0.64	0.70
Arginine	1.06	1.38
Histidine	1.62	2.19
Acide aspartique	0.99	1.10
Acide glutamique	0.94	1.20
Cystine	0.56	—
Tyrosine	1.54	1.60

Les chromatogrammes sont effectués en triple. Plusieurs hydrolysats de durées différentes peuvent être analysés (24 et 48 heures d'hydrolyse, par exemple).

Toutes les lectures de densité optique, multipliées par les facteurs de LEVY, sont additionnées. Pour chaque somme ainsi obtenue, on peut calculer un facteur pour lequel cette somme est égale à l'unité.

En éliminant les valeurs aberrantes qui proviennent indubitablement d'erreurs techniques ou d'imperfections chromatographiques, on peut calculer une moyenne de tous les résultats et les exprimer en fractions molaires (voir Tableau IX). En général, les résultats qui sont les plus variables sont ceux de la tyrosine (variabilité dans la synthèse), de la méthionine (dégradation possible) et de l'histidine (variabilité dans la synthèse et extraction délicate). D'après LEVY, les rapports molaires sont reproductibles à 2-3% près.

A partir de ces valeurs, on peut calculer le nombre de résidus d'acides aminés par poids moléculaire minimum de la protéine, en divisant la moyenne des valeurs des fractions molaires par celle d'entre elles qui conduit au résultat le plus voisin d'un nombre entier pour le plus grand nombre possible d'acides aminés (voir Tableau IX, exemple de la leucine). Les valeurs de la sérine sont corrigées (10%) par suite de la destruction partielle de cet aminoacide après 24 heures d'hydrolyse (REES²¹). Ces valeurs sont ensuite arrondies à la valeur unitaire la plus approchée (voir Tableau IX).

Il est évident qu'en partant des résultats en fractions molaires, on peut également connaître le nombre de résidus d'acides aminés pour 100 acides aminés de la molécule. Pour obtenir ce résultat, on additionne les lectures de densité optique multipliées par les facteurs de LEVY. Pour chaque somme, on peut trouver un facteur de correction tel qu'elle devienne égale à 100 (au lieu de 1 dans le calcul précédent). En multipliant tous les nombres par ce facteur, on peut donc exprimer les résultats sur la base de 100 résidus d'acides aminés.

TABLEAU IX
COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS D'UNE PRÉPARATION D' α -CORTICOTROPHINE
(D'après LEVY *et al.*⁴⁶)

Acide aminé	Résultats en fractions molaires			Moyenne des fractions molaires	Déviation de la moyenne (%)	Nombre de résidus d'acides aminés par poids mol. minimum	Nombre de résidus (valeur arrondies)
	I	II	III				
c. aspartique	0.0392	0.0503	0.0491	0.0462	10.1	1.72	2
c. glutamique	0.1345	0.1273	0.1282	0.1300	2.3	4.85	5
épine	0.0689	0.0690	0.0702	0.0694	0.9	2.85	3
lycocolle	0.0837	0.0818	0.0842	0.0832	1.2	3.10	3
lanine	0.0747	0.0753	0.0753	0.0751	0.3	2.80	3
roline	0.1107	0.1084	0.1087	0.1093	0.9	4.08	4
aline	0.0798	0.0798	0.0816	0.0804	1.0	2.99	3
léthionine	0.0235	0.0211	0.0212	0.0219	4.7	0.82	1
éucine	0.0291	0.0246	0.0268	0.0268	5.7	1.00	1
hénylalanine	0.0822	0.0809	0.0823	0.0818	0.8	3.05	3
tyrosine	0.0608	0.0647	0.0607	0.0621	2.8	2.32	2
lysine	0.1049	0.1073	0.1018	0.1047	1.8	3.91	4
histidine	0.0268	0.0272	0.0273	0.0271	2.1	1.01	1
arginine	0.0810	0.0821	0.0825	0.0819	0.4	3.06	3
tryptophane*							1
H ₂ amidé							2
Total	0.9998	0.9998	0.9999	0.9999	2.5	37.6	41

* Dosé par la méthode de GOODWIN ET MORTON⁵⁰.

En tenant compte du poids moléculaire de la molécule, on peut calculer le nombre de résidus de chaque acide aminé présent dans la molécule entière. Connaissant le nombre de chaque résidu pour 100 acides aminés, on multiplie ce nombre par le poids moléculaire de l'acide aminé correspondant. On fait la somme de tous les résultats. De la somme ainsi obtenue, on enlève la valeur de 1782, correspondant à 99 molécules d'eau. On calcule le rapport entre le poids moléculaire réel et le poids moléculaire partiel ainsi calculé. Le nombre de résidus pour 100 acides aminés multiplié par ce rapport donne le nombre de résidus pour l'ensemble de la molécule. Il suffit alors d'"arrondir" les valeurs pour connaître le nombre de résidus d'acide aminés par molécules (voir Tableau X). On peut également effectuer un calcul identique en tenant compte du nombre d'acides aminés trouvé pour le poids moléculaire minimum.

Enfin, s'il est nécessaire d'estimer les quantités absolues d'acides aminés présents dans le mélange, deux méthodes peuvent être appliquées (LEVY⁴³): l'une, la moins précise (2-5%) consiste en une conversion directe de la densité optique lue en micro-molécules au moyen d'un ensemble de coefficients d'extinction millimolaire. Ils ont la valeur $15.6/F$ ou F représente les facteurs du Tableau VIII. L'imprécision de ce procédé provient principalement des différences dans la récupération de la coloration à partir de plusieurs chromatogrammes. Ces différences n'ont pas d'importance dans la détermination des rapports molaires, car ces variations affectent tous les amino-acides d'une manière comparable.

La seconde méthode consiste à combiner la détermination plus précise (2-3%) des rapports molaires avec la détermination de la quantité totale d'acides aminés présents dans le mélange. Celle-ci peut être déduite de la consommation de soude au cours de la réaction de condensation (voir LEVY⁴³, LEVY *et al.*⁴⁶).

TABLEAU X
COMPOSITION DE L'HÉMÉRYTHRINE DE *Sipunculus nudus*
(Résultats personnels)

	Nombre de résidus pour 100 acides aminés	Nombre de résidus calculés d'après les valeurs de la colonne 1 sur la base d'un poids moléculaire de 66,000	Nombre de résidus dans l'hémérythrine (valeurs arrondies)
Gly	4.42	25.37	25
Ser	4.22	24.33	24
Thr	4.33	24.85	25
Pro	5.62	32.25	32
Ala	7.40	42.47	42
Met	0.38	2.18	2
Val	6.80	39.03	39
Leu	14.10	80.93	81
Phe	11.62	66.69	67
Lys	8.15	46.78	47
Tyr	3.80	21.80	22
Arg	2.42	13.89	14
His	4.36	25.02	25
Asp	13.82	79.32	79
Glu	8.10	46.49	46
Cys	0.34	1.94	2
			572 résidus

TABLEAU XI
DESTRUCTION APPROXIMATIVE DES DÉRIVÉS DINITROPHÉNYLÉS AU COURS DE L'HYDROLYSE
(D'après PORTER⁶⁰)

	Temps (h)	Quantité restante (%)
DNP-alanine	12	80
DNP-arginine	12	90
Acide DNP-aspartique	24	60
Di-DNP-cystine	12	25
Acide DNP-glutamique	12	75
DNP-glycocolle	8	40
DNP-hydroxyproline	4	40
DNP-leucine	12	80
DNP-isoleucine	12	80
Di-DNP-lysine	8	95
ϵ -DNP-lysine	12	95
DNP-méthionine	12	75
DNP-phénylalanine	12	70
DNP-proline	2	10
DNP-sérine	12	90
DNP-thréonine	24	90
DNP-tryptophanne	12	90
DNP-tyrosine	12	75
DNP-valine	12	80

b. Dosage d'un DNP-aminoacide en position N-terminale

Une certaine quantité de DNP-aminoacide terminal est détruite au cours de l'hydrolyse (à titre d'indication, voir le Tableau XI) et, d'autre part, les récupérations chromatographiques entraînent également des pertes (par exemple, récupération chromatographique de l'acide DNP-aspartique et de l'acide DNP-glutamique: 90%; de la di-DNP-lysine: 80%; de l'acide DNP-cystéique: 90%) (REDFIELD ET ANFINSEN⁷⁰).

Il faut donc tenir compte de ces pertes au cours des dosages. Pour les calculer, il est recommandé de soumettre à l'hydrolyse dans les mêmes conditions, en même temps que la protéine ou la DNP-protéine étudiée, une quantité déterminée du DNP-aminoacide identifié. La détermination de ces coefficients de destruction doit être

TABLEAU XII

RÉCUPÉRATION (%) DE LA DNP-SÉRINE APRÈS HYDROLYSE EN PRÉSENCE DE L' α -CORTICOTROPHINE ET DE SON DÉRIVÉ DINITROPHÉNYLÉ (D'après LEVY ET LI⁴⁷)

Expérience No.	Quantité de produit soumise à l'hydrolyse			Récupération de DNP-sérine* (%)
	DNP-sérine (μ moles)	α -Corticotrophine (μ moles)	DNP- α -corticotrophine (μ moles)	
1	1.0	0	0	86
1	1.0	0	1.0	93
2	0.2	0	0	69-67
2	0.2	0.2	0	52-47
2	0.2	0	0.2	70-78

* Récupération de la DNP-sérine non hydrolysée = 93%.

Exp. 1 = hydrolyse pendant 7 h à 105° par HCl 5.7 N (tube scellé sous vide).

Exp. 2 = hydrolyse pendant 16 h à 110° par HCl 5.7 N.

effectuée plusieurs fois. A titre d'exemple, les pourcentages de récupération de la DNP-sérine hydrolysée en présence de l' α -corticotrophine et de son dérivé dinitrophénylé sont reproduits dans le Tableau XII. Il est remarquable de constater que la destruction de la DNP-sérine augmentée en présence de la corticotrophine est diminuée en présence de la DNP-corticotrophine (voir également les expériences de DESNUELLE *et al.*²⁴ sur l'acide DNP-aspartique de la sérumalbumine).

L'interprétation des résultats du dosage d'un acide aminé en position terminale est très souvent délicate: il peut arriver que, malgré les corrections précédentes, la quantité récupérée ne représente qu'une assez faible partie de la molécule initiale.

BIBLIOGRAPHIE

¹ R. ACHER, *Thèse Doctorat Sciences Naturelles*, Paris, 1953.

² C. B. ANFINSEN, R. R. REDFIELD, W. L. CHOATE, J. PAGE ET W. R. CARROLL, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 201.

³ C. B. ANFINSEN, M. SELA ET H. TRITCH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 156.

⁴ K. BAILEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 612.

⁵ K. BAILEY ET F. R. BETTELHEIM, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 495.

- 6 A. R. BATTERSBY ET L. C. CRAIG, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1887; 74 (1952) 4023.
- 7 P. H. BELL *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 (1949) 897.
- 8 M. BERGMANN ET L. ZERVAS, *Biochem. Z.*, 203 (1928) 284.
- 9 M. BERGMANN, L. ZERVAS ET W. E. ROSS, *J. Biol. Chem.*, 111 (1935) 245.
- 10 F. R. BETTELHEIM, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 235.
- 11 G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- 12 S. BLACKBURN, *Nature*, 163 (1949) 955.
- 13 S. BLACKBURN ET A. G. LOWTHER, *Biochem. J.*, 48 (1951) 126.
- 14 J. H. BOWES ET J. A. MOSS, *Biochem. J.*, 55 (1953) 735.
- 15 G. BRAUNITZER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 2025.
- 16 G. BRAUNITZER ET K. H. REUTHER, *Makromol. Chem.*, 18/19 (1956) 501.
- 17 W. W. BROMER, A. STAUB, E. R. DILLER, H. L. BIRD, L. G. SINN ET O. K. BEHRENS, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 2794.
- 18 H. S. BURTON, *Chem. & Ind. (London)*, (1954) 576.
- 19 D. COLE, C. H. LI, J. I. HARRIS ET N. G. PON, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 903.
- 20 R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- 21 W. DASLER ET C. D. BAUER, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 18 (1946) 52.
- 22 J. W. DAVIES ET G. HARRIS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74 (1958) 229.
- 23 P. DESNUELLE ET C. FABRE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 49.
- 24 P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE, *Compt. rend.*, 233 (1951) 987.
- 25 S. R. DICKMAN ET R. O. ASPLUND, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5208.
- 26 V. DU VIGNEAUD ET C. E. MEYER, *J. Biol. Chem.*, 98 (1932) 295.
- 27 J. E. FOLK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 61 (1956) 150.
- 28 H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS ET A. L. LEVY, *Methods of Biochem. Anal.*, 2 (1955) 359.
- 29 H. FRAENKEL-CONRAT ET B. SINGER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 60 (1956) 64.
- 30 T. W. GOODWIN ET R. A. MORTON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 628.
- 31 F. C. GREEN ET L. M. KAY, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 726.
- 32 W. HAUSMANN, J. R. WEISIGER ET L. C. CRAIG, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 723.
- 33 D. HEIKENS, P. H. HERMANS ET P. F. VAN VELDEN, *Nature*, 174 (1954) 1187.
- 34 C. H. W. HIRS, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 611.
- 35 G. HÖGSTRÖM, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 743.
- 36 V. M. INGRAM ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 9.
- 37 C. F. JACOBSEN ET J. LEONIS, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 27 (1951) 333.
- 38 P. W. KENT, S. LAWSON ET A. SENIOR, *Science*, 113 (1951) 354.
- 39 G. KOCH ET W. WEIDEL, *Z. physiol. Chem.*, 303 (1956) 213 (et communication personnelle).
- 40 K. KOJIMA, K. MIZUNO ET M. MIYAZAKI, *Nature*, 181 (1958) 1200.
- 41 T. H. KRITCHEVSKY ET A. TISELIUS, *Science*, 114 (1951) 299.
- 42 W. A. LANDMANN, M. P. DRAKE ET W. P. WHITE, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4370.
- 43 A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.
- 44 A. L. LEVY ET D. CHUNG, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 396.
- 45 A. L. LEVY ET D. CHUNG, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 2899.
- 46 A. L. LEVY, I. I. GESCHWIND ET C. H. LI, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 187.
- 47 A. L. LEVY ET C. H. LI, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 487.
- 48 C. H. LI ET L. ASH, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 419.
- 49 C. H. LI, D. COLE, D. CHUNG ET J. LEONIS, *J. Biol. Chem.*, 227 (1957) 207.
- 50 I. M. LOCKHART ET E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.*, 58 (1954) 633.
- 51 I. M. LOCKHART, E. P. ABRAHAM ET G. G. F. NEWTON, *Biochem. J.*, 68 (1955) 536.
- 52 A. G. LOWTHER, *Nature*, 167 (1951) 767.
- 53 M. L. MCFADDEN ET E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 214 (1955) 185.
- 54 E. MARGOLIASH, *Nature*, 175 (1955) 293.
- 55 E. F. MELLON, H. H. KORN ET S. R. HOOVER, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 1675.
- 56 H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 489.
- 57 W. R. MIDDLEBROOK, *Nature*, 164 (1949) 501.
- 58 G. L. MILLS, *Biochem. J.*, 50 (1952) 707.
- 59 R. MONIER ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 551.
- 60 R. MONIER ET L. PENASSE, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1176.
- 61 A. NEUBERGER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 37 (1943) 515.
- 62 G. G. F. NEWTON ET E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.*, 53 (1953) 597.
- 63 S. M. PARTRIDGE ET T. SWAIN, *Nature*, 166 (1950) 272.
- 64 D. M. P. PHILLIPS, *Biochem. J.*, 68 (1958) 35.
- 65 R. R. PORTER, *Biochem. J.*, 46 (1950) 304.
- 66 R. R. PORTER, *Methods in Med. Research*, 3 (1951) 256.
- 67 R. R. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- 68 L. K. RAMACHANDRAN ET W. B. MCCONNELL, *Nature*, 176 (1955) 931.

- 60 K. R. RAO ET H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 1328.
70 R. R. REDFIELD ET C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 387.
71 M. W. REES, *Biochem. J.*, 40 (1946) 632.
72 E. E. RICE, *Biochem. Preparations*, 1 (1949) 63.
73 D. E. RIVARD, *Biochem. Preparations*, 3 (1953) 96.
74 M. ROVERY ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 541.
75 M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.
76 F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
77 F. SANGER, *Biochem. J.*, 40 (1946) 261.
78 F. SANGER, *Biochem. J.*, 45 (1949) 562.
79 F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 353.
80 F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 463.
81 F. S. SCANES ET B. T. TOZER, *Biochem. J.*, 63 (1956) 282.
82 W. A. SCHROEDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5118.
83 R. G. SHEPHERD *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 5051.
84 A. THOMPSON, *Nature*, 168 (1951) 390.
85 E. O. P. THOMPSON, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 563.
86 E. O. P. THOMPSON, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 565.
87 E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 440.
88 E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 643.
89 K. TITANI, H. YOSHIKAWA ET K. SATAKE, *J. Biochem. (Tokyo)*, 43 (1956) 737.
90 E. WALDSCHMIDT-LEITZ ET K. GAUSS, *Z. physiol. Chem.*, 293 (1953) 10.
91 S. G. WALEY, *Biochem. J.*, 64 (1956) 715.
92 M. B. WILLIAMSON ET J. M. PASSMANN, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 121.
93 A. J. WOIWOD, *J. Gen. Microbiol.*, 3 (1949) 312.
94 D. W. WOOLLEY, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 593.
95 E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 400.

Reçu le 15 décembre 1958