

## Note

### Analyse chromatographique d'analogues phosphoniques de dipeptides

H. JENSEN, F. HABAULT, A. M. LACOSTE, A. CASSAIGNE et E. NEUZIL

Laboratoire de Biochimie, U.E.R. III, Université de Bordeaux II, 146, rue Léo Saignat, 33076-Bordeaux (France)

(Reçu le 21 septembre 1976)

La mise en évidence de l'acide amino-2-éthylphosphonique (ciliatine, 2-AEPh) dans les produits d'hydrolyse de protéines<sup>1-3</sup> pose le problème des modalités de liaison de ce nouveau composé. Une première voie d'investigation consiste en l'étude de l'hydrolyse ménagée de phosphonoprotéines<sup>4</sup>; il est également possible d'étudier les propriétés de divers "phosphonopeptides" de synthèse, dont quelques représentants ont été déjà décrits<sup>5-10</sup>. Nous apportons ici quelques caractéristiques chromatographiques de dipeptides renfermant la ciliatine, composé naturel, ou son homologue inférieur, l'acide aminométhylphosphonique (AMPh); notre travail porte donc sur des composés de formule générale



molécules dépourvues d'atome de carbone asymétrique et sur les composés carboxyliques correspondants.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

##### Produits

Les deux acides aminés phosphoniques (AMPh, 2-AEPh) ont été synthétisés au laboratoire en suivant la méthode de Kosolapoff<sup>11</sup>. Les acides aminés carboxyliques, la taurine (Tau) et Gly-Gly sont des produits de E. Merck (Darmstadt, Allemagne fédérale); les dipeptides proviennent des firmes Cyclo (Los Angeles, Calif., États Unis), Sigma (Saint Louis, Mo., États Unis) et ICN (Cleveland, Ohio, États Unis), à l'exception des acides N-glycyl-aminométhylphosphonique (Gly-AMPh) et N-glycyl-amino-2-éthylphosphonique (Gly-2-AEPh), de la glycyl-taurine (Gly-Tau) et des acides N-β-alanylaminométhylphosphonique (β-Ala-AMPh) et N-β-alanyl-amino-2-éthylphosphonique (β-Ala-2-AEPh), synthétisés par nous mêmes selon une technique dérivée de la méthode de Fischer<sup>5</sup>. Les solvants utilisés pour les séparations chromatographiques sont tous des produits Merck, de grade pro-analyse; la ninhydrine est fournie par Touzart et Matignon (Paris, France).

##### Chromatographie sur papier

Nous avons utilisé indifféremment les papiers Schleicher et Schüll 2043b et

Whatman No. 1 en chromatographie descendante. Les quantités de produit déposées sont de  $0.5 \mu\text{mole}$  ( $5 \mu\text{l}$  d'une solution aqueuse  $0.1 M$ ). Après séchage, les composés sont révélés par trempage rapide du chromatogramme dans une solution acétonique de ninhydrine ( $0.5\%$ ); le groupement phosphonique peut être mis en évidence par le réactif de Bernhart et Chess<sup>12</sup>.

#### *Chromatographie sur couches minces*

La chromatographie a été réalisée sur plaques de cellulose plaques fines (Merck  $20 \times 20 \text{ cm}$ ) ou de gel de silice (gel de silice  $F_{254}$  sur feuille aluminium Merck). Après développement (migration du front d'au moins  $10 \text{ cm}$ ) et séchage, la révélation est effectuée uniquement avec la ninhydrine. Les résultats sont exprimés en mobilité relative par rapport à la glycine ( $R_G$ ).

#### *Chromatographie sur colonne*

La séparation chromatographique est réalisée à l'aide de l'appareil Technicon TSM, avec le programme classique destiné à l'analyse des liquides physiologiques et permettant la séparation des acides aminés usuels en  $5 \text{ h } 30 \text{ min}$ . Seule la colonne de séparation des acides aminés acides et neutres est utile (colonne,  $45 \times 0.5 \text{ cm I.D.}$ ; résine chromobeads Technicon  $C_3$ ;  $43^\circ$ ). Les produits étudiés, dissous en milieu chlorhydrique de pH 1 à la concentration de  $2.5 \text{ mM}$  en présence d'un standard interne de norleucine, sont déposés ( $20 \mu\text{l}$ ) sur le godet analytique; l'élution ( $0.45 \text{ ml/min}$ ) est effectuée par l'action successive de tampons citrate de lithium de pH étalés de 2.68 à 4.15. La détection met en oeuvre une solution de ninhydrine dans le méthylcellosolve, en présence d'acétate de sodium et de sulfate d'hydrazine ( $20 \text{ min}$  à  $95^\circ$ ; lecture à  $570 \text{ nm}$ , avec intégration utilisant l'appareil Infotronics).

#### *Electrophorèse sur papier*

La séparation électrophorétique met en oeuvre le papier Whatman 3 MM, à deux valeurs différentes de pH; on utilise une technique en toit avec évaporation du type de celle de Macheboeuf *et al.*<sup>13</sup> ( $3 \text{ V/cm}$ ;  $14 \text{ h}$ ); la révélation est effectuée avec une solution acétonique de ninhydrine à  $0.5\%$ , à laquelle on ajoute  $10\%$  de pyridine lorsque le tampon d'électrophorèse est acide.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats relatifs à la séparation chromatographique sur papier sont groupés dans le Tableau I. Le système VII permet une bonne différenciation des séries carboxylique, phosphonique et sulfonique et ceci aussi bien au niveau des aminoacides libres, des glycyllaminoacides et des  $\beta$ -alanyl aminoacides. On peut remarquer que les composés phosphoniques migrent moins rapidement que leurs analogues carboxyliques, malgré la présence de pyridine dans le milieu: en effet, avec une autre phase solvante renfermant de la pyridine, milieu plus propice à la formation de sels de pyridinium (système VI), le ralentissement des acides phosphoniques par rapport aux acides carboxyliques est moins net ou même inexistant<sup>14</sup>. Si l'on ne recherche que la séparation des deux séries carboxylique et phosphonique, les systèmes IIIa, IV et V peuvent convenir; le système V permet en outre, dans ces deux mêmes séries, une bonne séparation de Gly par rapport à  $\beta$ -Ala et de AMPH par

TABLEAU I

VALEURS DES  $R_F$  DE DIFFÉRENTS DIPEPTIDES, DE LEURS ANALOGUES PHOSPHONIQUES ET DES ACIDES AMINÉS CORRESPONDANTS EN CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Phases solvantes: (I) méthanol-eau (6:4); (II) éthanol-*n*-butanol-eau (2:2:1); (III) *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5); (IV) *tert*-butanol-acide formique-eau (14:3:3); (V) phénol ammoniacal<sup>14</sup>; (VI) acide acétique-pyridine-eau (7:10:3); (VII) *n*-butanol-pyridine-eau (1:1:1). La phase solvante III a été utilisée avec deux supports: papier non traité (IIIa) ou papier préalablement imprégné d'une solution aqueuse d'acétate de sodium à 0.8% (IIIb).

Composé	Phase solvante							
	I	II	IIIa	IIIb	IV	V	VI	VII
<i>Acides aminés</i>								
Glycine	0.58	0.26	0.23	0.15	0.43	0.43	0.37	0.23
$\beta$ -Alanine	0.75	0.18	0.35	0.28	0.50	0.65	0.54	0.26
AMPh	0.62	0.24	0.16	0.13	0.22	0.14	0.39	0.12
2-AEPH	0.63	0.07	0.15	0.11	0.26	0.31	0.39	0.13
Taurine	0.70	0.34	0.19	0.13	0.24	0.41	0.34	0.35
<i>Glycyl-peptides</i>								
Gly-Gly	0.62	0.18	0.26	0.16	0.32	0.59	0.36	0.22
Gly- $\beta$ -Ala	0.67	0.27	0.34	0.31	0.39	0.73	0.58	0.25
Gly-AMPh	0.56	0.11	0.11	0.06	0.15	0.27	0.31	0.09
Gly-2AEPH	0.65	0.08	0.12	0.07	0.22	0.35	0.31	0.12
Gly-Tau	0.74	0.33	0.11	0.09	0.16	0.52	0.23	0.31
<i><math>\beta</math>-Alanyl-peptides</i>								
$\beta$ -Ala-Gly	0.72	0.11	0.29	0.20	0.40	0.69	0.39	0.23
$\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala	0.75	0.14	0.37	0.36	0.47	0.82	0.59	0.25
$\beta$ -Ala-AMPh	0.73	0.06	0.13	0.08	0.21	0.41	0.34	0.13
$\beta$ -Ala-2-AEPH	0.77	0.07	0.13	0.09	0.26	0.51	0.37	0.16

rapport à 2-AEPH, ainsi que des dipeptides correspondants. Le système VI ne conduit qu'à de mauvaises séparations, mais cependant individualise bien la  $\beta$ -alanine et les peptides renfermant la  $\beta$ -alanine en position C-terminale. Le système II permet enfin une bonne différenciation des acides aminés phosphoniques et de la taurine ainsi que des glycylpeptides correspondants.

En chromatographie sur papier, la mobilité d'un dipeptide X-Y apparaît d'une manière générale voisine de celle de l'acide aminé Y (comparaison de Gly,  $\beta$ -Ala, Gly- $\beta$ -Ala et  $\beta$ -Ala-Gly); la différence de comportement chromatographique par rapport à Y libre peut être la résultante de deux effets opposés: l'acylation du groupement aminé de Y tend à réduire la mobilité, surtout lorsqu'on met en oeuvre une phase solvante acide, tandis que l'allongement de la chaîne de X s'accompagne d'un accroissement du  $R_F$ .

Les essais effectués en chromatographie en couche mince sont inclus dans le Tableau II. Les deux supports utilisés, gel de silice et cellulose, conduisent à des résultats très voisins lorsqu'on utilise les phases solvantes III et VIII. Les déplacements observés sur cellulose sont habituellement plus importants qu'avec le gel de silice (phases solvantes IX et surtout V et XI), support qui conduit à une très forte adsorption des dérivés phosphoniques; la séparation des deux séries carboxylique et phosphonique est réalisée avec la plupart des systèmes, tant au niveau des acides aminés

TABLEAU II

VALEURS DES  $R_G$  DE DIFFÉRENTS DIPEPTIDES, DE LEURS ANALOGUES PHOSPHONIQUES ET DES ACIDES AMINÉS CORRESPONDANTS EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Phases solvantes: (III) *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5); (V) phénol ammoniacal; (VIII) chloroforme-méthanol-ammoniacque à 17% (2:2:1); (IX) *tert.*-butanol-acétone-eau (12:2:5); (X) pyridine-dioxanne-ammoniacque ( $d = 0.88$ )-eau (35:35:15:15); (XI) phénol-acide formique à 15% (85:15).

Composé	Gel de silice					Cellulose					
	III	V	VIII	IX	XI	III	V	VIII	IX	X	XI
Glycine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$\beta$ -Alanine	1.33	1.51	0.85	0.90	1.24	1.39	1.95	1.05	1.10	1.06	1.70
AMPh	0.55	0.19	0.10	0.00	0.38	0.60	0.38	0.145	0.60	0.08	1.07
2-AEPh	0.48	0.27	0.13	0.00	0.35	0.68	0.89	0.13	0.69	0.09	1.47
Taurine	1.00	1.06	1.10	1.23	0.89	0.85	0.85	1.15	1.58	1.50	1.08
Gly-Gly	0.73	0.81	1.15	0.47	1.00	0.84	1.19	0.90	0.45	1.17	1.31
Gly- $\beta$ -Ala	1.10	1.07	1.27	0.52	1.14	1.48	2.07	1.10	0.75	1.33	1.70
Gly-AMPh	0.42	0.16	0.27	0.00	0.21	0.32	0.67	0.28	0.40	0.11	1.07
Gly-2-AEPh	0.50	0.16	0.35	0.00	0.26	0.31	1.03	0.32	0.20	0.14	1.54
Gly-Tau	0.55	0.81	1.25	1.10	0.58	0.48	1.02	1.20	0.96	2.03	1.06
$\beta$ -Ala-Gly	0.80	1.12	0.95	0.63	1.18	1.04	1.93	0.95	0.72	1.20	1.78
$\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala	1.46	1.19	1.09	0.72	1.28	1.53	2.62	1.13	0.97	1.40	1.93
$\beta$ -Ala-AMPh	0.53	0.25	0.17	0.09	0.21	0.53	1.03	0.33	0.67	0.20	1.67
$\beta$ -Ala-2-AEPh	0.46	0.34	0.24	0.18	0.30	0.63	1.53	0.33	0.42	0.15	1.58

libres qu'à celui des dipeptides; les deux acides aminés phosphoniques et les peptides correspondants se différencient peu les uns des autres, sauf toutefois lorsqu'une phase solvante renfermant du phénol (V ou VI) migre sur un support cellulosique. La migration rapide de la  $\beta$ -alanine libre, et des deux dipeptides à  $\beta$ -alanine C-terminale, déjà notée en chromatographie sur papier, apparaît particulièrement nette en chromatographie sur couche mince de cellulose avec la phase solvante V; comme en chromatographie sur papier, la migration du dipeptide X-Y reflète le plus souvent le comportement de Y.

En chromatographie sur papier ou sur couches minces, les dipeptides à glycine N-terminale, après pulvérisation de ninhydrine, conduisent à des taches jaune la coloration mauve classique n'apparaissant qu'ultérieurement.

La chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (Fig. 1) permet une excellente séparation des acides aminés libres, puisque l'on observe les temps d'éluion suivants (min): 10, taurine; 14, AMPh; 22, 2-AEPh; 95, Gly; 183,  $\beta$ -Ala; le témoin de norleucine est élué dans les mêmes conditions à la 165e min. On observe de même une bonne différenciation des dipeptides à glycine N-terminale (11, Gly-Tau; 22, Gly-AMPh; 49, Gly-2-AEPh; 149, Gly-Gly; 180, Gly- $\beta$ -Ala) ainsi que des peptides à  $\beta$ -alanine N-terminale (19,  $\beta$ -Ala-AMPh; 52,  $\beta$ -Ala-2-AEPh; 150,  $\beta$ -Ala-Gly; 210,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala). On notera toutefois que ce programme ne permet pas la séparation de la taurine et de la Gly-Tau, et que la ciliatine est pratiquement confondue avec le Gly-AMPh. La vitesse d'éluion est conditionnée, pour les dipeptides étudiés, par le caractère acide de l'acide aminé C-terminal: aussi les temps d'éluion de Gly-Gly et

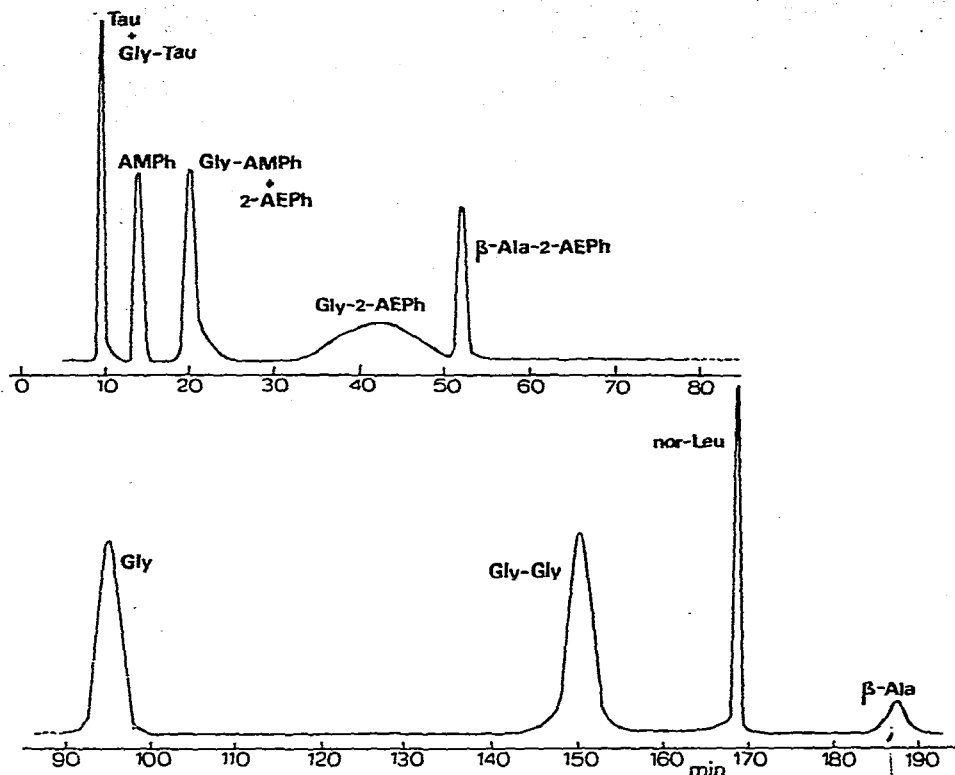


Fig. 1. Chromatogramme de différents dipeptides, de leurs analogues phosphoniques et des acides aminés correspondants.

### TABEAU III

#### MIGRATION DE DIFFÉRENTS DIPEPTIDES, DE LEURS ANALOGUES PHOSPHONIQUES ET DES ACIDES AMINÉS CORRESPONDANTS EN ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER

Solutions tampons utilisées: ( $T_1$ ) acide acétique-acide formique-eau (78:25:897), pH 1.85; ( $T_2$ ) pyridine-acide acétique-eau (6:20:974), pH 3.9; ( $T_3$ ) pyridine-acide acétique-eau (100:4:900), pH 6.5. Dépôt: 5  $\mu$ l d'une solution 100 mM effectué à 20 cm du bord du papier. La migration, exprimée en millimètres, est affectée du signe + ou du signe -, selon qu'elle s'effectue en direction de l'anode ou de la cathode.

Composé	$pK'_1$	$pI$	Tampon		
			$T_1$	$T_2$	$T_3$
Glycine	2.34	5.97	+185 mm	+ 49 mm	- 24 mm
$\beta$ -Alanine	3.60	6.90	+238	+ 98	- 24
AMPh	1.85	3.60	+ 42	+ 36	-108
2-AEPH	2.45	4.72	+ 57	+ 41	- 60
Taurine	1.50	5.12	+ 42	+ 45	- 28
Gly-Gly	3.12	5.65	+195	+ 65	- 28
Gly- $\beta$ -Ala			+192	+114	- 22
Gly-AMPh	2.40	4.25	+ 64	+ 44	- 54
Gly-2-AEPH			+ 74	+ 44	- 32
Gly-Tau			+ 34	+ 40	- 21
$\beta$ -Ala-Gly			+188	+ 66	- 22
$\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala			+183	+113	- 20
$\beta$ -Ala-AMPh			+ 49	+ 39	- 50
$\beta$ -Ala-2-AEPH			+ 76	+ 47	- 31

de  $\beta$ -Ala-Gly sont-ils très voisins, comme ceux des couples Gly- $\beta$ -Ala et  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Gly-AMPh et  $\beta$ -Ala-AMPh, ou enfin Gly-2-AEPh et  $\beta$ -Ala-2-AEPh.

En électrophorèse sur papier (Tableau III), le tampon T<sub>1</sub> permet une migration particulièrement rapide des deux acides aminés carboxyliques (glycine et  $\beta$ -alanine) aussi bien libres que sous la forme de dipeptides. Cette constatation s'applique également au tampon T<sub>2</sub>, mais les différences de migration observées sont plus faibles tandis que la  $\beta$ -alanine libre ou engagée dans un dipeptide en position C-terminale, s'individualise nettement. Le tampon T<sub>3</sub> de pH 6.5 différencie bien l'AMPh libre ou engagé dans un dipeptide.

De nos essais électrophorétiques se dégage une corrélation assez satisfaisante, mais non absolue, entre les valeurs des migrations et l'état d'ionisation<sup>15,16</sup>.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Mmes. Monique Malgat et Françoise Denois de leur collaboration technique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. S. Kirkpatrick et S. H. Bishop, *Biochemistry*, 12 (1973) 2829.
- 2 R. L. Hilderbrand, T. O. Henderson, T. Glonek et T. C. Myers, *Biochemistry*, 12 (1973) 4756.
- 3 E. D. Korn, D. G. Dearborn, H. M. Fales et E. A. Sokolovski, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 2257.
- 4 F. A. Shelburne, *Ph. Dissertation*, Duke University, Durham; 1968.
- 5 J. C. Pralon, H. Jensen et E. Neuzil, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 109 (1970) 85.
- 6 K. Yamauchi, M. Kinoshita et M. Imoto, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 45 (1972) 2531.
- 7 W. F. Gilmore et H. A. McBride, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1087.
- 8 M. Hariharan, R. J. Motekaitis et A. E. Martell, *J. Org. Chem.*, 40 (1975) 470.
- 9 J. W. Huber, W. F. Gilmore et L. W. Robertson, *J. Med. Chem.*, 18 (1975) 106.
- 10 K. Yamauchi, Y. Mitsuda et M. Kinoshita, *Bull. Chem. Soc. J.*, 48 (1975) 3285.
- 11 G. M. Kosolapoff, *J. Amer. Chem. Soc.*, 69 (1947) 2112.
- 12 D. N. Bernhart et W. B. Chess, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 1026
- 13 M. Macheboeuf, J. M. Dubert et P. Rebeyrotte, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35 (1953) 346.
- 14 E. Neuzil et A. Cassaigne, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1967, p. 3994.
- 15 J. P. Greenstein et M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, John Wiley, New York, 1961, pp. 486-488.
- 16 V. Chevane, *Ann. Chim.*, 4 (1949) 352.