

MODIFICATION DE LA TYROSINE LORS DE L'ELIMINATION PAR ACIDOLYSE
DU GROUPE PROTECTEUR O-BENZYLE

Y. Trudelle et G. Spach

Centre de Biophysique Moléculaire, 45-Orléans-La Source, France.

(Received in France 10 July 1972; received in UK for publication 13 July 1972)

Le groupe hydroxyle de la tyrosine est fréquemment protégé en synthèse peptidique sous forme d'éther benzylique. L'élimination de ce groupe protecteur doit être réalisée sans entraîner de modification de la tyrosine, ce qui risquerait d'affecter les propriétés des peptides synthétisés.

Cette modification est réalisée soit par hydrogénation catalytique, soit par acidolyse, dans HF liquide ou dans une solution de HBr exempt de brome dans l'acide acétique ou l'acide trifluoroacétique. Dans le cas de l'acidolyse, il est nécessaire d'ajouter au milieu réactionnel un "capteur"(scavenger) de carbocations benzyles tel que l'anisole(1), le résorcinol(2), la méthionine(2)(3)(4), le sulfure d'éthyle et de méthyle(5), le phosphite de diéthyle(5), afin d'éviter une substitution du noyau aromatique de la tyrosine(1). Pour effectuer l'acidolyse, le système HBr/TFA est largement utilisé en synthèse peptidique, en particulier pour sa commodité d'emploi.

Bien que nous ayons eu recours à des modes opératoires déjà couramment employés, il est apparu que l'élimination par HBr/TFA des groupes benzyles de copolypeptides du type $(\text{[Tyr(Bzl)]}_x - \text{[Glu(OBzl)]}_y)_n$ produit une modification de la tyrosine que nous avons mise en évidence par spectroscopie UV. Par contre, l'emploi de HBr/AcOH permet d'obtenir des résultats corrects.

Résultats expérimentaux

La présente étude a été entreprise à la suite de l'observation préliminaire suivante. Comparant les spectres UV, en solution alcaline, de deux échantillons de poly(Tyr-Glu-Glu), préparés par des voies différentes, nous avons observé des différences notables entre les positions des bandes d'absorption vers 243 et 294 nm et entre les valeurs du coefficient d'extinction de la bande vers 243 nm.

Conditions d'élimination des protections des chaînes latérales des copolypeptides protégés

Nature du copolypeptide protégé	Traitement	Capteur	Méthode de (a) purification	Expérience N°
[Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)] _n	HBr/TFA 1h30, 20°C	Anisole 0,11 ml/ml TFA 30 éq./1 éq.Tyr	A	I Fig. 1 B
	HBr/TFA 1h30, 20°C	Résorcinol 0,13 g/ml TFA 30 éq./1 éq.Tyr	A	II Fig. 1 C
	HBr/AcOH 6N 1h, 20°C	Anisole 0,041 ml/ml AcOH 30 éq./1 éq.Tyr	A + Traitement à baryte	III Fig. 1 D et 2 B
[Tyr(Z),Glu(OBzl)], 40:60	HBr/Benzène 24h, 20°C	sans	A	IV
[Tyr(Z)-Glu(OTMB)-Glu(OTMB)] _n (b)	HBr/AcOH 2N 4h, 20°C	sans	A	V
[Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)] _n	HBr/AcOH 6N =3 TFA =1 72h, 4°C (c)	sans	B	VI Fig. 2 A
	HBr/AcOH 6N 1h, 20°C	Anisole 0,041 ml/ml AcOH 30 éq./1 éq.Tyr	A	VII Fig. 2 A

(a) Méthode A: dissolution dans NaOH 0,1N, dialyse contre de l'eau, précipitation à HCl 1N.
Méthode B: identique à A, sans dialyse. (b) TMB: triméthylbenzyl. (c) D'après Ramachandran (6).

Les spectres -figure 1- des échantillons I et II (spectres B et C) présentent effectivement une allure différente de celle du spectre de l'échantillon III (spectre D), bien que tous proviennent du même copolypeptide protégé. De plus, les échantillons IV (copolymère statistique) et V possèdent des spectres, non représentés ici, identiques au spectre D, très voisin de celui de la polytyrosine (spectre A). On observe plus précisément sur les spectres B et C un déplacement des maxima d'absorption vers les longueurs d'onde élevées et un abaissement du coefficient d'extinction de la bande à 244 nm = 7980 pour I, 8970 pour II, tandis que l'on trouve 10320 pour III, 10500 pour V et 10100 pour la poly-L-tyrosine(7). Comme nous le verrons plus loin le traitement par HBr/AcOH ne modifie pas le noyau aromatique de la tyrosine. Dans ces conditions le spectre D peut être pris comme spectre de référence du copolypeptide (Tyr-Glu-Glu)_n. Les spectres B et C révèlent donc une modification de la tyrosine.

Un phénomène analogue est observé si l'on traite la O-benzyltyrosine par HBr/TFA. Le spectre du produit résultant diffère sensiblement de celui de la tyrosine. (Produit résultant : λ_{\max} : 295 nm, $\epsilon_{240}/\epsilon_{295} = 4,32$; tyrosine 294 nm, 4,70). La présence d'anisole réduit l'importance du phénomène sans toutefois le supprimer. La chromatographie sur papier du produit résultant montre qu'il contient de la tyrosine et un autre composé en proportion moindre, révélable à la ninhy-

drine. Nous avons vérifié que la modification du spectre de la tyrosine ne provient pas d'une élimination incomplète des groupes O-benzyles, car on ne peut obtenir un spectre présentant les modifications déjà décrites en ajoutant de la O-benzyltyrosine à de la tyrosine pure.

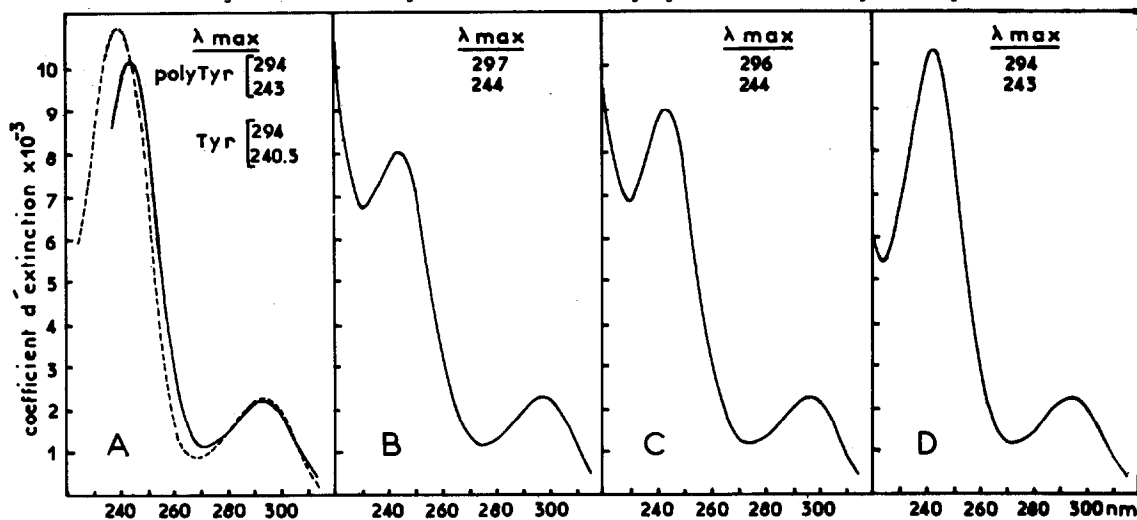


Figure 1 : Modification de la tyrosine par traitement de Tyr(Bzl) par HBr/TFA. Spectres UV. A: (---) tyrosine, dans NaOH 0,2N, NaCl 0,1M ; (—) poly-L-tyrosine dans NaCl 0,2M, pH 13,5 d'après Fasman (?), préparée à partir de poly-O-acétyltyrosine et de poly O-benzylloxycarbonyl-L-tyrosine. 0,02 %, cuve 1 mm. B: copolypeptide I, 0,07 %, C: copolypeptide II, 0,0554 % ; D: copolypeptide III, 0,066 %. B, C, D : solvant NaOH 0,2N, NaCl 0,1M. Cuve 1 mm.

D'autre part, l'échantillon III de $(\text{Tyr-Glu-Glu})_n$ soumis à l'action de HBr/TFA ne révèle aucune altération de son spectre UV. En outre, de la tyrosine soumise au même traitement, en présence d'alcool benzylique, ne subit aucune altération. C'est donc au niveau de l'élimination des groupes benzyles, qu'intervient la modification de la tyrosine, vraisemblablement par benzylation du noyau aromatique, ce qui est en accord avec le sens du déplacement des maxima d'absorption. L'addition d'eau au TFA, suggérée par Sieber(8), ne réduit que très faiblement l'importance du phénomène.

L'utilisation de HBr/AcOH 6N, en présence d'anisole, ne provoque aucune modification irréversible de la tyrosine, mais seulement la formation partielle de O-acétyltyrosine, le groupe acétyle étant aisé à éliminer par simple dissolution du produit dans de la soude 0,1N, ou de la baryte 0,37N (9). Nous avons vérifié que la O-benzyltyrosine, traitée dans ces conditions, conduisait à la formation de tyrosine pure.

La présence de O-acétyltyrosine dans les produits traités par HBr/AcOH est visible -figure 2- sur les spectres IR (épaulement à 1760 cm^{-1}) et sur les spectres UV (bandes vers 265 et 273nm(10)).

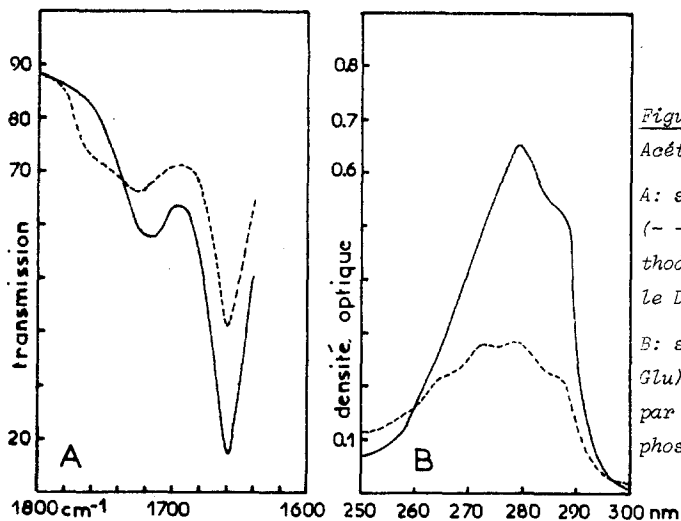


Figure 2 :

Acétylation de la tyrosine par HBr/AcOH.

A: spectres IR de copolypeptides (Tyr-Glu)_n, (- -) VI, brut (—) VII, purifié par méthode A. Films à partir d'une solution dans le DMSO.

B: spectres UV de copolypeptides (Tyr-Glu-Glu)_n, (- -) III, brut (—) III, purifié par méthode A. 0,19% dans le triméthylphosphate, cuve 1 mm.

Remarquons que les conditions opératoires employées par Ramachandran et coll. (6) -voir tableau- pour la préparation du copolymère (Tyr-Ala-Glu)_n, entraînent, ainsi que nous l'avons vérifié sur un copolymère (Tyr-Glu)_n, une acétylation et une légère modification de la tyrosine.

Conclusion

Nos résultats montrent que l'utilisation de capteurs tels que l'anisole ou le résorcinol ne permet pas de préserver la tyrosine d'une réaction de modification lors de la coupure du groupe O-benzyle par HBr/TFA. Par conséquent, ce mode opératoire ne nous semble pas recommandable en synthèse peptidique en présence de tyrosine. Par contre, l'emploi de HBr/AcOH ne présente pas d'inconvénient.

Nous remercions Madame A. Caille de sa collaboration technique.

REFERENCES

- (1) F. Weygand, W. Steglich, Z. Naturforsch. (1959) 14b, 472.
- (2) R.B. Merrifield, A. Marglin, "Peptides" Proceedings of the 8th European Peptide Symposium, North-Holland Pub. Co. (1967) p. 85.
- (3) A. Marglin, R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. (1966) 5051.
- (4) E. Bayer, G. Jung, H. Hagenmaier, Tetrahedron (1968) 24, 4853.
- (5) ST. Guttman, R.A. Boissonas, Helv. Chim. Acta (1959) 42, 1257.
- (6) J. Ramachandran, A. Berger, E. Katchalski, Biopolymers (1971) 10, 1829.
- (7) G.D. Fasman, E. Bodenheimer, C. Lindblow, Biochemistry (1964) 3, 1665.
- (8) P. Sieber, "Peptides" Proceedings of the 9th European Peptide Symposium, North-Holland Pub. Co. (1968) p. 236.
- (9) L. Bailey, J. Chem. Soc. (1950) 3461.
- (10) B. Myers et A.N. Glazer, J. Biol. Chem. (1971) 246, n°2, 412.