

## MÉTHODE POUR LA CARACTÉRISATION DES GROUPES CARBOXYLIQUES TERMINAUX DANS LES PROTÉINES. APPLICATION À L'INSULINE

par

CLAUDE FROMAGEOT, MARIAN JUTISZ,  
DENISE MEYER ET LUCIEN PENASSE

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Paris (France)*

Dans une note récente<sup>1</sup>, nous avons brièvement indiqué une méthode qui, appliquée à l'insuline, nous avait permis la caractérisation des groupes carboxyliques libres des acides aminés situés aux extrémités des chaînes peptidiques. Dans le présent travail, en apportant des données qui n'avaient pu prendre place dans la note précédente, nous décrivons cette méthode plus en détail, avec les améliorations que nous y avons apportées depuis.

Rappelons qu'elle consiste à traiter la protéine par l'hydruure double de lithium et d'aluminium, de sorte que seuls les groupes carboxyliques libres soient réduits en groupes alcools primaires, ce mode de réduction étant basé sur les travaux de NYSTROM ET BROWN<sup>2</sup>. L'identification des aminoalcools primaires ainsi obtenus se fait, après hydrolyse de la protéine traitée, puis séparation de ces aminoalcools, par chromatographie sur papier; leur détermination quantitative se fait par dosage au moyen de l'acide periodique. Cette méthode nécessite ainsi la connaissance du comportement, au cours de la chromatographie sur papier, de chacun des aminoalcools correspondant à chacun des aminoacides constituant la protéine.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### I. SYNTHÈSE DE DIVERS AMINOALCOOLS ET ÉTUDE DE LEUR COMPORTEMENT AU COURS DE LEUR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Sauf la colamine, nous avons synthétisé les aminoalcools primaires par réduction des esters éthyliques des acides aminés correspondant au moyen de l'hydruure double de lithium et d'aluminium, selon la technique de KARRER, PORTMANN ET SUTER<sup>3</sup> pour alaninol, sérinol, thréoninol, valinol, leucinol, isoleucinol, prolinol, phénylalaninol, tyrosinol, aspartidiol et glutamidiol, et de KARRER, SUTER ET WASER<sup>4</sup> pour histidinol. Le leucinol, décrit<sup>5</sup> comme une huile, cristallise à la glacière en aiguilles fondant aux environs de 15°; d'autre part, le thréoninol, liquide, le valinol, cristallisé à la glacière et liquide à la température ordinaire, l'isoleucinol et le glutamidiol, tous deux liquides, n'avaient pas encore été obtenus par cette voie. Nous avons appliqué également la technique de KARRER, PORTMANN ET SUTER<sup>3</sup> à la préparation du lysinol et de l'argininol;

mais il ne nous a pas été possible d'avoir ces deux aminoalcools à l'état pur par le mode de réduction en question: les produits obtenus nous ont toujours donné, à côté des taches qui leur sont propres, d'autres taches par chromatographie sur papier. Néanmoins ces produits, quelque imparfaits qu'ils aient été, nous ont suffi pour nous permettre d'être sûrs de l'absence des deux bases hexoniques correspondantes comme acides aminés terminaux dans l'insuline.

La chromatographie sur papier de ces aminoalcools a été étudiée dans divers solvants parallèlement à celle des aminoacides correspondants. Comme ces derniers, les aminoalcools peuvent être révélés par la ninhydrine<sup>6, 6</sup>, quoique la réaction soit 10 à 20 fois moins sensible. Le prolinol donne avec la ninhydrine une tache jaune, comme la proline; il est donc préférable, pour révéler cet aminoalcool, d'utiliser l'isatine qui fournit une tache bleue stable<sup>7</sup>. Les résultats obtenus avec quelques solvants sont présentés dans le Tableau I.

On voit que, avec les solvants utilisés, les  $R_F$  des aminoalcools sont supérieurs aux  $R_F$  des aminoacides correspondants. D'autre part, il apparaît parfaitement possible, par l'emploi de solvants convenablement choisis, de caractériser sans ambiguïté chacun des aminoalcools. Les valeurs de  $R_F$  indiquées dans le Tableau I sont celles des aminoalcools sous forme de bases libres; l'utilisation des aminoalcools sous forme de leurs chlorhydrates et la présence de sels minéraux sont susceptibles de modifier légèrement ces valeurs; cette remarque concerne plus particulièrement le chlorure de lithium et le chlorure d'aluminium, entraînés par l'éther lors de l'extraction des aminoalcools. Il est facile de tenir compte de telles modifications par des chromatographies témoins et des chromatographies mixtes.

## II. CARACTÉRISATION DES GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES TERMINAUX DE L'INSULINE

Nos investigations ont porté sur des échantillons d'insuline cristallisée qui nous ont été offerts soit par la Maison Choay, Paris, (insuline à 20 U.I./mg) soit par Dr J. LENS, Organon, Oss (Pays-Bas) (insuline à 27 U.I./mg). Les résultats qualitatifs ont été identiques dans tous les cas. Voici le mode opératoire suivi dans une des expériences portant sur un échantillon d'insuline néerlandaise, insuline de boeuf, à 27 U.I./mg:

300 mg de la protéine finement broyée et soigneusement séchée sous vide, sont mis en suspension dans 50 ml de N-éthylmorpholine additionnée de 0.02% de zéphyrol (chlorure de diméthyl-alkyl-benzyl-ammonium), pour favoriser la dispersion de la phase solide. Le tout est agité énergiquement (agitateur magnétique), pendant qu'on y introduit goutte à goutte une solution de 160 mg d'hydrure double de lithium et d'aluminium dans 50 ml de N-éthylmorpholine, l'hydrure métallique utilisé ici étant particulièrement pur. L'opération se fait à 55°, sous azote sec; elle dure 8 heures. Au bout de ce temps, on décompose l'hydrure subsistant par addition de quelques gouttes d'eau, puis on filtre sur Büchner. On élimine soigneusement la N-éthylmorpholine par lavages à l'éther du précipité que constituent la protéine traitée et le résidu minéral provenant de l'hydrure métallique, puis on porte quantitativement ce précipité dans un ballon où la protéine est hydrolysée par 30 ml d'acide chlorhydrique 6 N pendant 24 heures. L'acide chlorhydrique introduit doit être sensiblement plus concentré (environ 9 N) pour tenir compte de sa neutralisation partielle par les bases résultant de la décomposition de l'hydrure métallique. Lorsque l'hydrolyse est terminée, on élimine l'acide chlorhydrique libre par des concentrations sous vide successives, alternant avec des additions d'eau

distillée; finalement, le liquide résiduel placé dans un exsiccateur est amené à l'état sirupeux, alcalinisé à  $p_H$  9-10 par quelques gouttes de soude concentrée, le liquide étant maintenu froid, puis absorbé aussi complètement que possible par une quantité convenable de "Hyflosupercel"\*. La masse obtenue est extraite par l'éther au soxhlet pendant 30 heures. A la solution éthérée obtenue, on ajoute 5 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique  $N/150$ , on élimine l'éther par évaporation, puis on complète par de l'eau le volume du liquide résiduel à 10 ml. C'est sur cette solution (solution IR) que l'on effectue les caractérisations et les dosages.

### Etude qualitative

Une première série de chromatographies sur papier en utilisant soit le solvant I,

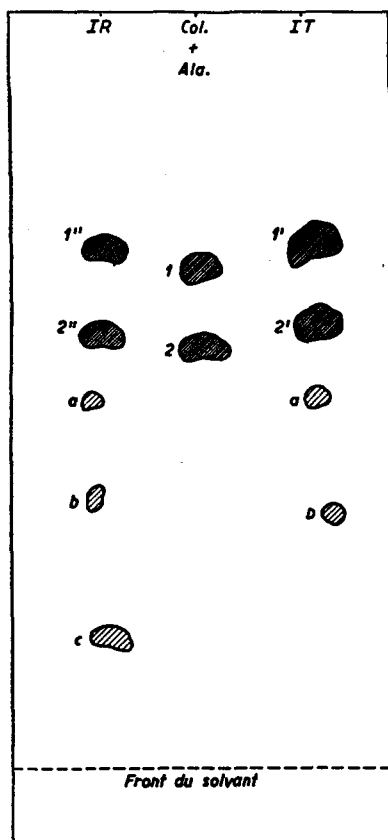


Fig. 1. Chromatographie sur papier de la solution IR, d'une solution de chlorhydrate de colamine et de chlorhydrate d'alaninol (Col + Ala) et de la solution IT. Développement par le solvant I (*n*-butanol 77 + acide acétique 6 + eau 17). Révélation par la ninhydrine

soit le solvant III (voir Tableau I), permet d'observer l'existence de deux taches très nettes, dont les  $R_F$  correspondent, à un léger décalage près, aux  $R_F$  du chlorhydrate de colamine et du chlorhydrate d'alaninol respectivement. En outre il apparaît quelques taches plus faibles, ne correspondant à aucun autre aminoalcool connu.

Pour pouvoir identifier avec certitude la colamine et l'alaninol, nous avons opéré de la façon suivante: 160 mg d'hydrure double de lithium et d'aluminium ont été décomposés par un peu d'eau; au produit résultant on ajoute 200 mg d'insuline, 5 ml d'une solution aqueuse contenant 5.0 mg de colamine et 8.9 mg d'alaninol, et 20 ml d'acide chlorhydrique 9 *N*. Le tout est maintenu à l'ébullition à reflux pendant 24 heures. Au bout de ce temps, on continue les opérations comme dans le cas de la réduction proprement dite de l'insuline. On obtient ainsi la solution IT.

Sur une même feuille de papier on effectue parallèlement la chromatographie de la solution IR, de la solution IT, et d'une solution aqueuse des chlorhydrates de colamine et d'alaninol. Les résultats, très nets, sont illustrés par la Fig. 1.

Ces résultats montrent que:

1. Les taches 1' et 2' données par la solution IT, et qui correspondent respectivement au chlorhydrate de colamine et au chlorhydrate d'alaninol, sont légèrement décalées vers le haut par rapport aux taches 1 et 2 données par la solution pure des mêmes chlorhydrates. Ce décalage est due aux sels contenus dans la solution IT, sels dont nous avons pu en effet constater la présence, et qui sont les mêmes et en même quantité que dans la solution IR.

\* Hyflosupercel (Johns Manville & Co, New-York) purifié par lavage à l'eau et à l'éther, puis séché à 110°.

TABLEAU I

VALEURS DES  $R_F$  DE DIVERS AMINOALCOOLS PRIMAIRES ET  
DES AMINOACIDES CORRESPONDANTS

Solvant I: *n*-butanol 77 + acide acétique 6 + eau 17  
Solvant II: *n*-butanol saturé d'eau contenant 0.1% de  $NH_3$   
Solvant III: phénol saturé d'eau contenant 0.1% de  $NH_3$   
Papier Whatman n° 1  
Température  $\sim 22^\circ$

	$R_F$		
	I	II	III
Glycocolle	0.07	0.06	0.33
Colamine	0.18	0.15	0.74
Alanine	0.13	0.12	0.56
Alaninol	0.25	0.23	0.83
Sérine	0.06	0.06	0.32
Sérinol	0.16	0.15	0.69
Thréonine	0.10	0.09	0.48
Thréoninol	0.17	0.31	—
Valine	0.30	0.24	0.77
Valinol	0.40	0.49	$\sim 1$
Leucine	0.46	0.44	0.81
Leucinol	0.53	0.63	$\sim 1$
Isoleucine	0.44	0.39	0.82
Isoleucinol	0.50	0.63	$\sim 1$
Proline	0.15	0.14	0.88
Prolinol	0.28	0.26	$\sim 1$
Phénylalanine	0.39	0.44	0.82
Phénylalaninol	0.54	0.70	$\sim 1$
Tyrosine	0.21	0.24	0.59
Tyrosinol	0.40	0.54	0.81
Ac. aspartique	0.05	0.01	0.17
Aspartidiol	0.19	0.23	0.82
Ac. glutamique	0.09	0.01	0.23
Glutamidiol	0.21	0.23	0.85
Lysine	0.02	0.01	0.53
Lysinol	0.08	0.07	0.78
Arginine	0.04	0.03	0.68
Argininol	0.08	0.07	—
Histidine	0.03	0.07	0.64
Histidinol	0.08	0.12	—

2. Les taches 1" et 2" données par la solution IR, dont les  $R_F$  sont identiques à ceux des taches 1' et 2' peuvent être ainsi attribuées avec certitude au chlorhydrate de colamine et au chlorhydrate d'alaninol, respectivement.

3. Parmi les taches autres, les taches *a* et *b* se trouvent avec la solution IT comme avec la solution IR; elles ne témoignent donc pas de la présence d'autres aminoalcools que la colamine et l'alaninol. La tache *c*, qui n'est donnée que par la solution IR possède un  $R_F$  supérieur à ceux de tous les aminoalcools et aminoacides connus; elle est due probablement à quelque artefact.

### *Etude quantitative*

Nous avons effectué sur la solution IR et sur la solution IT les dosages suivants: Azote total (Kjeldahl); azote de l'ammoniac dégagé par action de l'acide periodique, sur l'ensemble des aminoalcools, selon la technique appliquée par MARTIN ET SYNGE<sup>8</sup> aux aminoacides hydroxylés; acétaldéhyde formé par action de l'acide periodique sur l'alaninol, cet acétaldéhyde étant recueilli et dosé par iodométrie, d'après la technique utilisée par WINNICK<sup>9</sup> dans le cas de la thréonine; ions chlore<sup>10</sup>. La colamine est calculée par différence. En ce qui concerne le dosage de l'acétaldéhyde, qui permet de déterminer l'alaninol, il convient de remarquer que cet aldéhyde est ici le seul aldéhyde volatil auquel on puisse avoir à faire; son dosage par iodométrie est donc parfaitement justifié.

Les chiffres obtenus sont donnés dans le Tableau II.

TABLEAU II  
ÉTUDE QUANTITATIVE DES AMINOALCOOLS FORMÉS PAR RÉDUCTION DE L'INSULINE  
Explications dans le texte.

	IT	IR	IR cor.
N total (mg)			
Théorique	2.72	1.40	1.40
Trouvé	1.62	0.76	1.26
Trouvé %	60	54	90
N de $NH_3$ (mg)			
Théorique	2.72	1.40	1.40
Trouvé	1.47	0.69	1.28
Trouvé %	54	49	91
Alaninol (mg)			
Théorique	8.90	3.75	3.75
Trouvé	2.80	1.30	4.06
Trouvé %	32	35	108
Colamine (mg)			
Théorique	5.00	3.05	3.05
Trouvé	4.20	2.30	2.74
Trouvé %	84	72	90
Cl <sup>-</sup> -trouvé (mg)	110	110	—

D'après ces chiffres, il apparaît tout d'abord que la récupération des aminoalcools de la solution IT est loin d'être quantitative; des expériences faites à ce point de vue nous ont montré que les pertes en les aminoalcools étaient dues d'une part à leur

volatilité au moment des évaporations, volatilité qui, même en présence d'acide chlorhydrique peut provoquer des pertes atteignant 40% de la quantité totale des aminoalcools présents, et d'autre part à l'imperfection de l'extraction proprement dite. Nous cherchons actuellement à remédier à ces défauts; mais déjà les résultats obtenus avec la solution IT fournissent des facteurs de correction permettant d'évaluer la quantité des aminoalcools initialement présents dans l'hydrolysate de la protéine réduite, à partir de la quantité présente dans la solution finalement obtenue (solution IR).

L'application de ces facteurs aux résultats correspondant à la solution IR donne les chiffres indiqués sous la colonne "IR cor."; on voit que ceux-ci sont très voisins des valeurs calculées en supposant qu'il se forme par réduction 2 molécules de colamine et 2 molécules d'alaninol par molécule élémentaire (12,000 g) d'insuline. La réduction des groupes carboxyliques libres en groupes alcools primaires paraît donc avoir été quantitative.

#### DISCUSSION

Les résultats du présent travail montrent que dans la molécule élémentaire d'insuline deux molécules de glycocolle et deux molécules d'alanine ont leurs groupes carboxyliques libres. Or SANGER<sup>11</sup> a mis en évidence le fait que la molécule élémentaire d'insuline, de poids moléculaire voisin de 12,000, est constituée par quatre sous-éléments, chacun de ces sous-éléments étant une chaîne peptidique reliée aux autres par des ponts disulfure; ces chaînes peptidiques sont deux à deux identiques ou tout au moins extrêmement voisines. Dans deux de ces chaînes peptidiques, correspondant à la fraction A de SANGER, l'acide aminé *initial*, à groupe aminé libre, est le glycocolle; dans les deux autres, correspondant à la fraction B, c'est la phénylalanine. Ainsi, il n'existe en tout dans la molécule élémentaire d'insuline que deux acides aminés *initiaux* différents, représentés chacun par deux molécules. Il apparaît donc particulièrement intéressant de ne trouver également dans la même molécule élémentaire que deux acides aminés *terminaux*, à groupes carboxyliques libres, le glycocolle et l'alanine, et qui ne sont aussi représentés chacun que par deux molécules. Ce résultat apporte un argument de plus à l'identité des chaînes peptidiques dans chacune des fractions A et B de SANGER. D'autre part, on peut attribuer dès maintenant l'alanine terminale aux chaînes peptidiques de la fraction A et le glycocolle terminal à celles de la fraction B, car, d'après SANGER<sup>12</sup>, les chaînes peptidiques de la fraction A, dont le glycocolle constitue l'acide aminé initial, ne contiennent pas d'autre molécule de glycocolle.

La détection de l'alanine comme acide aminé terminal dans l'insuline confirme en outre les résultats obtenus par LENS<sup>13</sup> avec une tout autre technique.

L'un des points les plus importants dans la présente méthode de caractérisation, dans les protéines, des acides aminés terminaux à groupes carboxyliques libres, est que les liaisons peptidiques ne soient pas scindées au cours de la réduction par l'hydrure métallique. Une preuve qu'une telle scission n'a pas lieu est le fait que la réduction, comme elle est réalisée ici, ne fournit que les deux aminoalcools en question, et seulement en les quantités indiquées, alors que s'il y avait scission de liaisons peptidiques on trouverait plusieurs autres aminoalcools, et vraisemblablement en proportions plus élevées.

Nous exprimons tous nos remerciements à Professor SCHLESINGER, University of Chicago, qui nous a aimablement offert des échantillons de divers hydrures métalliques; à Professor WELDON G. BROWN, University of Chicago, qui nous a donné de précieux

conseils sur l'emploi de ces divers hydrures, notamment de l'hydrure double de lithium et d'aluminium; à Dr CHOAY, Paris et à Dr LENS, Oss, auxquels nous devons les échantillons d'insuline cristallisée. Nous tenons à remercier tout spécialement Dr E. LEDERER, Institut de Biologie, Paris, pour l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail, intérêt qui s'est manifesté, notamment, par d'importantes suggestions.

### RÉSUMÉ

La méthode préconisée consiste à traiter la protéine étudiée par l'hydrure double de lithium et d'aluminium, au sein de N-éthylmorpholine, de sorte que seuls les groupes carboxyliques libres soient réduits en groupes alcools primaires. L'identification des aminoalcools primaires ainsi obtenus se fait, après hydrolyse de la protéine traitée, puis extraction de ces aminoalcools, par chromatographie sur papier; leur détermination quantitative se fait par dosage au moyen de l'acide périodique.

Appliquée à l'insuline, cette méthode a montré que, dans la molécule élémentaire d'insuline de poids moléculaire voisin de 12,000, deux molécules de glycolle et deux molécules d'alanine ont leurs groupes carboxyliques libres. L'alanine terminale appartient aux chaînes peptidiques de la fraction A de SANGER, et le glycolle terminal à celles de la fraction B.

Les valeurs des  $R_F$  de quinze aminoalcools dans divers solvants ont été déterminées.

### SUMMARY

A method is described in which the protein under investigation is treated with hydride of lithium and aluminium ( $\text{LiAlH}_4$ ) in a suspension of N-ethylmorpholine. By this method, the free carboxyl groups only are reduced to primary alcohol groups. The identification of the primary amino-alcohols thus formed is carried out by paper chromatography after hydrolysis of the protein and subsequent extraction of the amino-alcohols. Their quantitative determination is effected with the help of periodic acid.

Application of this method to insulin shows that in the elementary unit of insulin (molecular weight about 12,000) two molecules each of glycolol and alanine possess free carboxylic groups.

The terminal alanine belongs to the peptide chains of SANGER's fraction A, the terminal glycolol to those of fraction B.

The  $R_F$  values of fifteen amino-alcohols in various solvents have been determined.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die beschriebene Methode besteht darin, das zu analysierende Protein, suspendiert in N-Äthylmorpholin, mit Lithium-Aluminiumhydrid ( $\text{LiAlH}_4$ ) zu behandeln und dadurch ausschliesslich die freien Carboxylgruppen zu primären Alkoholgruppen zu reduzieren. Die so erhaltenen primären Aminoalkohole werden, nach Hydrolyse des behandelten Proteins und darauf folgender Extraktion, mittels der Papierchromatographie identifiziert. Die erhaltenen Aminoalkohole werden quantitativ mit Perjodsäure bestimmt.

Die Anwendung dieser Methode auf Insulin führt zu der Erkenntnis, dass in der Insulin-Elementarmolekel mit dem Molekulargewicht von ungefähr 12,000, zwei Moleküle Glykokoll und zwei Moleküle Alanin ihre Carboxylgruppen frei haben. Das endständige Alanin gehört zu den Peptidketten der SANGERSchen Fraktion A, das endständige Glykokoll zu denjenigen der Fraktion B.

Die  $R_F$ -Werte von fünfzehn Aminoalkoholen in verschiedenartigen Lösungsmitteln wurden bestimmt.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> CL. FROMAGEOT, M. JUTISZ, D. MEYER ET L. PÉNASSE, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1905.
- <sup>2</sup> R. F. NYSTROM ET W. G. BROWN, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 2548.
- <sup>3</sup> P. KARRER, P. PORTMANN ET M. SUTER, *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948) 1617.
- <sup>4</sup> P. KARRER, M. SUTER ET P. WASER, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 1936.
- <sup>5</sup> C. NEUBERG, *Biochem. Z.*, 56 (1913) 500; 67 (1914) 56.
- <sup>6</sup> E. CHARGAFF, C. LEVINE ET CH. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 67.
- <sup>7</sup> R. ACHER, CL. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- <sup>8</sup> A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 294.
- <sup>9</sup> T. WINNICK, *J. Biol. Chem.*, 142 (1942) 461.
- <sup>10</sup> K. FAJANS, in *Neuere Massanalytische Methode*, F. Enke, Stuttgart, 1937.
- <sup>11</sup> F. SANGER, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 14 (1949) 153.
- <sup>12</sup> F. SANGER, Communication personnelle.
- <sup>13</sup> J. LENS, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 367.

Reçu le 20 septembre 1950