

# DÉTERMINATION DE SÉQUENCES D'ACIDES AMINÉS DANS DES OLIGOPEPTIDES PAR LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE—V

## STRUCTURE DE LA "VAL<sup>6</sup>-PEPTIDOLIPINE NA", NOUVEAU PEPTIDOLIPIDE DE *NOCARDIA ASTEROIDES*\*†

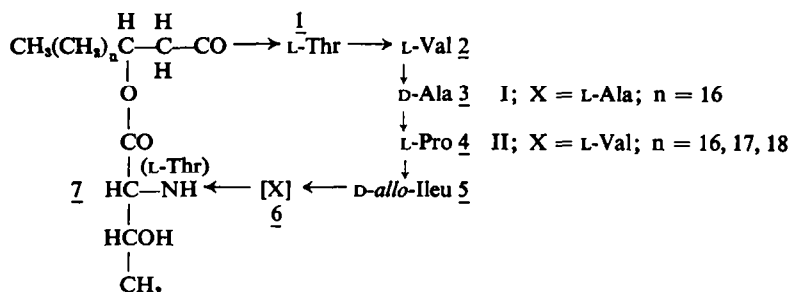
M. GUINAND, M. J. VACHERON, G. MICHEL  
Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences de Lyon,  
43, Bld du 11 Novembre 1918, Villeurbanne (Rhône)

B. C. DAS et E. LEDERER  
Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S.,  
Gif-sur-Yvette (Essonne)

(Received 8 December 1965)

**Abstract**—Structure II is established for a new peptidolipid isolated from *Nocardia asteroides*; this compound differs from the previously described peptidolipin NA (I) by the replacement of one L-alanine in position 6 by one L-valine. Due to previous experience with mass spectrometry of analogous compounds, the unequivocal determination of the sequence of the amino acids of this heptapeptide derivative could be very rapidly accomplished, without chemical degradation.

DANS des communications antérieures<sup>1-5</sup> nous avons décrit l'isolement et établi la structure de la peptidolipine NA (I), peptidolipide de *Nocardia asteroides*, souche ATCC 9969. C'est une lactone macrocyclique, C<sub>80</sub>H<sub>89</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>, dans laquelle l'acide D(−)3-hydroxyeicosanoïque est lié, d'une part sous forme d'amide au groupement NH<sub>2</sub> de la thréonine N-terminale d'un heptapeptide L-Thr-L-Val-D-Ala-L-Pro-D-allo-Ileu-L-Ala-L-Thr, et d'autre part, par une liaison ester au groupement -COOH de la thréonine C-terminale. Cette structure (I), établie par dégradation chimique<sup>2</sup> a été vérifiée par la spectrométrie de masse.<sup>3</sup>



\* Ce travail est dédié à la mémoire du Professeur H. Stephen.

† IV<sup>e</sup> communication, voir.<sup>15</sup>

12<sup>e</sup> communication sur les constituants des *Nocardia*. 11<sup>e</sup> communication, voir.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> M. Guinand, G. Michel et E. Lederer, *C.R. Acad. Sci. Paris* **246**, 848 (1958).

<sup>2</sup> M. Guinand, G. Michel et E. Lederer, *C.R. Acad. Sci. Paris* **259**, 1267 (1964).

<sup>3</sup> M. Barber, W. A. Wolstenholme, M. Guinand, G. Michel, B. C. Das et E. Lederer, *Tetrahedron Letters* 1331 (1965).

<sup>4</sup> M. Guinand, *Thèse de Doctorat*, Lyon (1965).

<sup>5</sup> M. Guinand et G. Michel, *Biochim. Biophys. Acta* sous presse (1966).

La peptidolipine NA est accompagnée d'un autre peptidolipide en petite quantité; dans le présent mémoire, nous montrons que ce "compagnon" a la structure d'une Val<sup>6</sup>-peptidolipine NA (II).<sup>6</sup>

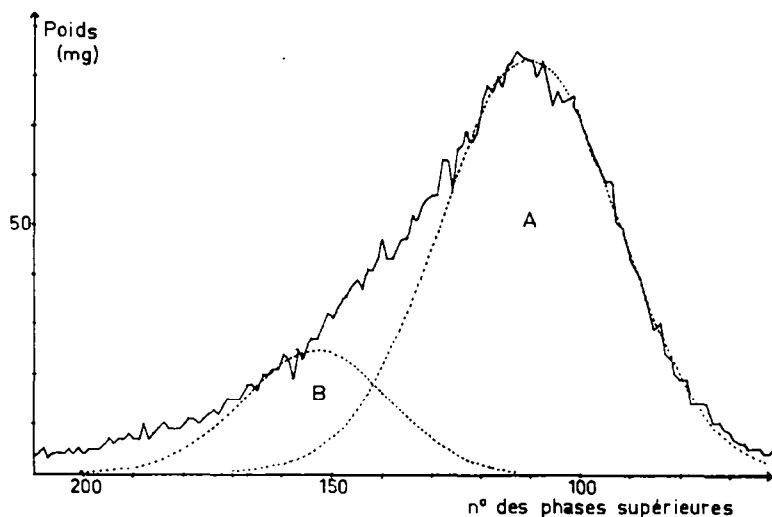


FIG. 1. Distribution à contre-courant du peptidolipide brut. La fraction A correspond à la peptidolipine NA. En pointillé, des courbes de distribution théoriques.

**Isolément.** La fraction peptidolipidique brute est obtenue par extraction du mycélium de *N. asteroides* avec un mélange alcool-éther (1:1). Après évaporation des solvants, elle est insoluble dans l'eau et dans l'éther. Le fractionnement des peptidolipides est effectué par distribution à contre-courant avec le système de solvants: hexane, tétrachlorure de carbone, méthanol, eau (2:2:4:0:3:8:0:3).<sup>4,5</sup> La courbe de distribution (Fig. 1) indique la présence d'un constituant principal A, la peptidolipine NA déjà décrite<sup>1-5</sup> et d'un ou de plusieurs autres composés correspondant à la partie B de la courbe. La fraction B est soumise à une nouvelle distribution à contre-courant dans le même système de solvants. La courbe de distribution expérimentale (Fig. 2) est assez étalée et ne montre pas de résolution en pics distincts.

La chromatographie sur couches minces indique la présence de quatre substances dans les fractions III et IV (Fig. 3). Celle ayant le  $R_f$  le plus élevé a été isolée à l'état pur par chromatographie sur couches minces.

**Propriétés et composition chimique.** Le nouveau peptidolipide est un solide incolore, F. 221–223°,  $[\alpha]_D = +70^\circ(\text{CHCl}_3)$ . L'analyse élémentaire est en accord avec la formule  $\text{C}_{52}\text{H}_{83}\text{N}_7\text{O}_{11}$ .

Un hydrolysât chlorhydrique est analysé sur Amberlite CG 120 selon la méthode de Spackman *et al.*<sup>7</sup>; les amino acides existent dans le rapport moléculaire suivant: Ala<sub>1</sub>, allo-Ileu<sub>1</sub>, Pro<sub>1</sub>, Thr<sub>2</sub>, Val<sub>2</sub>. La présence d'allo-isoleucine est confirmée par

<sup>6</sup> Pour la nomenclature des analogues de structure de peptides, voir: W. Rittel, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker et R. Schwyzer, *Helv. Chim. Acta.* **40**, 614 (1957); P. A. Jaquenoud et R. A. Boissonnas, *Helv. Chim.* **42**, 788 (1959); K. Jost, J. Rudinger et F. Šorm, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **26**, 2496 (1961).

<sup>7</sup> D. H. Spackman, W. H. Stein et S. Moore, *Analyt. Chem.* **30**, 1190 (1958).

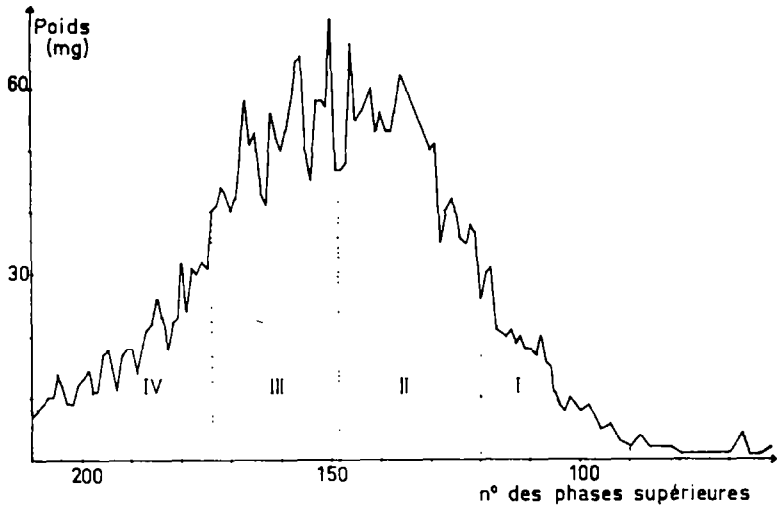


FIG. 2. Distribution à contre-courant de la fraction B de Fig. 1. Les fractions III et IV contiennent la Val<sup>6</sup>-peptidolipine NA.

#### CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

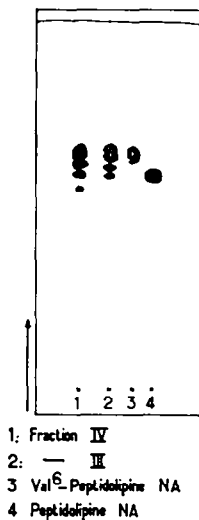


FIG. 3. Chromatographie sur couches minces des fractions III et IV de la Fig. 2, de la peptidolipine NA et de la Val<sup>6</sup>-peptidolipine NA.

chromatographie sur papier dans le solvant alcool amylique tertiaire-acide acétique-eau (20:1:20) qui sépare les trois acides aminés: leucine, isoleucine et *allo*-isoleucine.<sup>8</sup>

La configuration optique des acides aminés est précisée par action de la D-amino acide oxydase.<sup>9</sup> L'alanine et l'*allo*-isoleucine sont détruites et par conséquent existent sous la forme D. La partie peptidique du nouveau peptidolipide semble donc être un heptapeptide de formule brute: D-Ala<sub>1</sub>, D-*allo*-Ileu<sub>1</sub>, L-Pro<sub>1</sub>, L-Thr<sub>2</sub>, L-Val<sub>2</sub>. Si l'on

<sup>8</sup> D. O. Gray, J. Blake, D. H. Brown et L. Fowden, *J. Chromatog.* 13, 276 (1964).

<sup>9</sup> S. I. Ishii et B. Witkop, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 1832 (1963).

compare cette formule avec celle de la partie peptidique de la peptidolipine NA,<sup>2-5</sup> on constate la présence d'une molécule de L-valine supplémentaire et l'absence d'une molécule de L-alanine. On peut donc supposer que la molécule de L-valine remplace celle de L-alanine en position 6 dans la séquence peptidique; cette hypothèse conduirait à la formule II.

**Spectrométrie de masse.** Le spectre de masse du nouveau peptidolipide (Fig. 4) montre un pic moléculaire ( $M_1$ ) à  $m/e$  991 correspondant à la formule  $C_{62}H_{83}N_7O_{11}$  mentionnée ci-dessus et des pics à  $m/e$  1005 ( $M_2$ ) et 1019 ( $M_3$ ) indiquant la présence de deux homologues supérieurs. L'allure générale du spectre ressemble de près à celle du spectre de la peptidolipine NA (dont le pic moléculaire est à  $m/e$  963).<sup>3</sup>

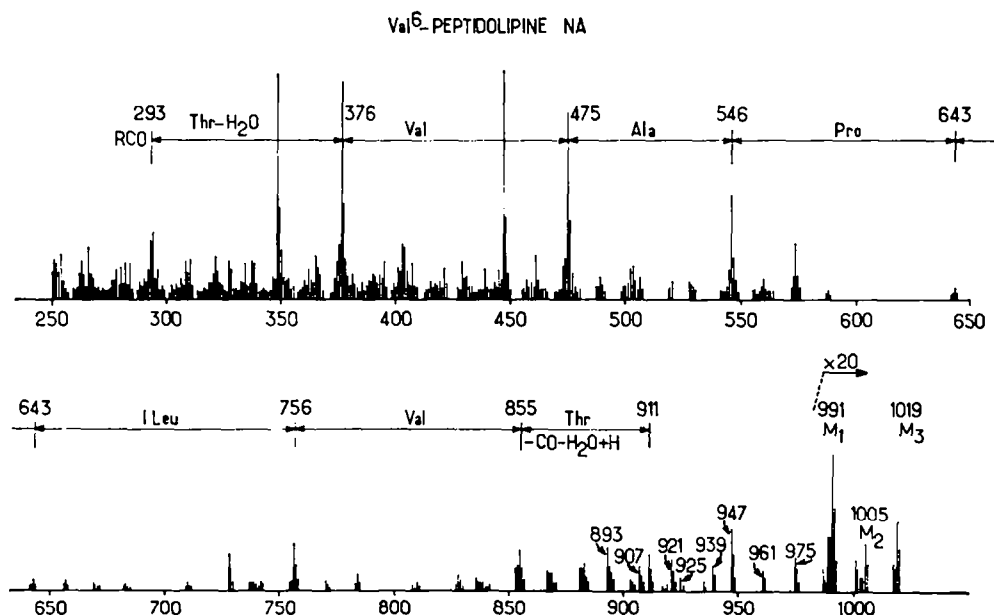


FIG. 4. Spectre de masse de la Val<sup>6</sup>-peptidolipine NA (II).

En tenant compte des résultats de l'analyse des acides aminés et de l'analogie des deux spectres, l'interprétation du spectre de masse du nouveau peptidolipide conduit à la structure d'une Val<sup>6</sup>-peptidolipine NA (II).

A partir du pic moléculaire  $M_1$  à  $m/e$  991 il y a formation d'un ion à  $m/e$  947 ( $M_1-44$ ) par perte de  $CO_2$  à partir du groupement lactonique<sup>10</sup>; la perte de deux molécules d'eau (apparemment à partir des deux unités de thréonine) conduit ensuite au pic à  $m/e$  911 ( $M_1-44-36$ ). Des pics correspondants dérivés des homologues supérieurs se trouvent à  $m/e$  975 (et 961) et à  $m/e$  939 (et 925).<sup>11</sup>

Le pic à  $m/e$  855 est attribué à la perte, à partir de l'ion à  $m/e$  911 de l'anhydro-thréonine C-terminale décarboxylée; nous avons discuté précédemment le mécanisme de cette fragmentation.<sup>3</sup>

Le prochain pic intense à  $m/e$  756, formé par la perte de 99 unités de masse à partir

<sup>10</sup> L'élimination de  $CH_3CHO$  de la thréonine C-terminale peut également contribuer à la formation de l'ion  $M_1-44$  à  $m/e$  947<sup>9</sup>.

<sup>11</sup> Une troisième molécule d'eau est éliminée conduisant aux pics à  $m/e$  893, 907 et 921.

de l'ion à  $m/e$  855, indique la présence d'une unité de valine à côté de la thréonine C-terminale.

Tous les autres pics significatifs en-dessous de  $m/e$  756 sont essentiellement les mêmes que ceux trouvés dans le spectre de la peptidolipine NA. La séquence des autres acides aminés en découle, si l'on tient compte également des résultats de l'analyse chimique: la présence d'un petit pic à  $m/e$  643 peut être attribuée à la perte d'une unité d'*allo*-isoleucine à partir de l'ion à  $m/e$  756. La perte successive de Pro, Ala, Val et d'anhydrothréonine donne les ions à  $m/e$  546, 475, 376 et 293, respectivement.

Les pics intenses à  $m/e$  728, 447 et 348 sont probablement dûs à la perte de CO à partir des ions, à  $m/e$  756, 475 et 376.

Des mesures de masses des pics à  $m/e$  348 et 447 montrent qu'ils correspondent, respectivement à  $C_{23}H_{42}NO$  et  $C_{28}H_{51}N_2O_2$ , en accord avec l'interprétation donnée ci-dessus.

Cependant, le pic à  $m/e$  376 donne, à haute résolution, un doublet dont un pic correspond à la composition élémentaire  $C_{24}H_{42}NO_2$  attendue, tandis que l'autre correspond à la formule  $C_{25}H_{46}NO$ . Ce dernier correspond donc à l'ion homologue supérieur du pic à  $m/e$  348.

De même, le pic à  $m/e$  475 est un doublet correspondant aux formules  $C_{29}H_{51}N_2O_3$  et  $C_{30}H_{55}N_2O_2$ .

L'ensemble de ces résultats confirme clairement l'hypothèse émise ci-dessus, selon laquelle le nouveau peptidolipide est une *Val*<sup>6</sup>-peptidolipine NA(II).

Le remplacement d'un acide aminé par un autre, dans un oligopeptide microbien, est bien connu, par exemple, dans la chimie des actinomycines (voir Brockmann *et al.*<sup>12</sup>).

Remarquons que grâce à l'expérience acquise antérieurement,<sup>3,13-15</sup> dans le domaine de la spectrométrie de masse de dérivés d'acyl-oligopeptides, la détermination de la séquence des acides aminés dans l'heptapeptide de la *Val*<sup>6</sup>-peptidolipine NA(II) a pu être réalisée en moins de deux heures; à part le dosage des acides aminés, aucune dégradation chimique n'a été nécessaire.<sup>16</sup>

## DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

L'extraction du peptidolipide brut a déjà été décrite.<sup>1,2,5</sup>

*Distribution à contre-courant.* Nous avons utilisé un appareil automatique Towers composé de 210 tubes d'une contenance de 80 ml. 5 g environ de peptidolipide sont soumis à une distribution à contre-courant avec le système de solvants hexane: tétrachlorure de carbone: méthanol: eau (2:2:4:0:3:8:0:3). Les opérations comprennent une série fondamentale de 120 transferts, suivie de 210 retraits de la phase supérieure recueillie avec un collecteur automatique Towers CL 450. La majeure partie du produit se trouve dans ces phases supérieures (voir Fig. 2). Nous avons réuni arbitrairement les phases supérieures suivantes:  $n^{\circ}0$  à 120, fraction I;  $n^{\circ}121$  à 148, fraction II;  $n^{\circ}149$  à 174, fraction III;  $n^{\circ}175$  à 210, fraction IV.

<sup>12</sup> H. Brockmann, G. Pampus et J. H. Manegold, *Chem. Ber.* **92**, 1294 (1959).

<sup>13</sup> M. Barber, P. Jollès, E. Vilkas et E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 469 (1965).

<sup>14</sup> F. Lanéelle, J. Asselineau, W. A. Wolstenholme et E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2133 (1965).

<sup>15</sup> E. Bricas, J. Van Heijenoort, M. Barber, W. A. Wolstenholme, B. C. Das et E. Lederer, *Biochemistry* **4**, 2254 (1965).

<sup>16</sup> Pour la détermination des séquences d'acides aminés de peptides (et des peptides) par spectrométrie de masse, voir aussi: N. S. Wulfsen, V. A. Puchkov, B. V. Rozinov, Yu. V. Denisov, V. N. Bochkarev, M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, E. I. Vinogradova et M. Yu. Feigina, *Tetrahedron Letters* 2805 (1965) et B. J. Millard, *Ibid.* 3041 (1965).

**Chromatographie sur couches minces.** Les fractions III et IV (Fig. 2) ont été analysées par chromatographie sur couches minces de gel de silice avec le solvant chloroforme-méthanol (90:10). La révélation par les vapeurs d'iode indique la présence de quatre substances de  $R_f = 0.54, 0.57, 0.60$  et  $0.62$  (Fig. 3). A côté de la peptidolipine NA,  $R_f = 0.57$ , la tache principale a un  $R_f$  de  $0.62$ . Le produit correspondant est obtenu à l'état pur par chromatographie préparative sur couches minces. 50 mg environ sont répartis sur une plaque de  $250 \times 350$  mm. La tache principale ( $R_f = 0.62$ ) est recueillie et le produit est élué par le mélange chloroforme-méthanol (90:10). Après élution et évaporation du solvant, le produit est repris par le minimum de chloroforme, reprecipité par addition d'éther, filtré et séché sous vide sur  $P_2O_5$  à  $135^\circ$  sous  $0.01$  mm. On obtient un solide incolore, F.221–223°,  $[\alpha]_D = +40^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 0.43$ ).

*Analyse:*

Calculé pour $C_{48}H_{88}N_7O_{11}$ ( $M_1$ )	C 62.93	H 9.44	N 9.88
$C_{48}H_{88}N_7O_{11}$ ( $M_2$ )	63.25	9.51	9.74
$C_{54}H_{97}N_7O_{11}$ ( $M_3$ )	63.58	9.58	9.61
Trouvé	63.27	9.63	9.45

**Analyse quantitative des acides aminés.** L'hydrolyse du peptidolipide (1.5 mg) est effectuée pendant 64 heures à  $110^\circ$  par HCl 6N. L'hydrolysate repris par 1 ml de tampon citrate 0.2N (pH = 3.25) est chargé sur une colonne d'Amberlite CG 120. L'éluat est recueilli par fractions de 1 ml. Les dosages sont effectués par la ninhydrine selon la méthode colorimétrique de Moore et Stein.<sup>17</sup> Pour la proline, nous avons utilisé la méthode de Chinard.<sup>18</sup> Les colorations à  $570 m\mu$  sont traduites en  $\mu$ moles d'acides aminés au moyen de courbes témoins établies pour la leucine et pour la proline. Le rapport molaire trouvé est:



**Action de la D-aminoacide oxydase.** Un hydrolysate du peptidolipide renfermant de 1 à 2  $\mu$ moles de chacun des acides aminés est repris par 0.2 ml de tampon pyrophosphate 0.1M à pH 8.2. On ajoute 0.2 ml d'une solution de FAD à 1 mg pour 10 ml de tampon et 1 mg de D-aminoacide oxydase. On laisse à  $37^\circ$  pendant 6 heures, puis on dessalifie sur Dowex-2; le produit obtenu est analysé par chromatographie sur papier.

**Spectrométrie de masse.** La substance (environ 0.1 mg) est placée à l'extrémité en céramique du système d'introduction directe, lequel est alors introduit par l'intermédiaire d'un sas dans la source d'ions d'un spectromètre de masse MS9 (A.E.I., Manchester).

La substance est évaporée par chauffage à presque  $300^\circ$ . Le spectre à basse résolution est obtenu à une résolution d'environ 1200; la mesure de masse de certains pics a été effectuée à une résolution d'environ 15.000.

**Remerciements**—Ce travail a bénéficié de subventions de la "Fondation Waksman pour le Développement des Etudes microbiologiques en France" et du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (U.S. Public Health Service), Grant AI-02838.

<sup>17</sup> S. Moore et W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* **211**, 893 et 907 (1954).

<sup>18</sup> F. P. Chinard, *J. Biol. Chem.* **199**, 91 (1952).