

SUR L'ACYLATION DES GROUPEMENTS THIOLS PROTÉIQUES

par

P. DESNUELLE ET M. ROVERY

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Marseille

Il est admis à l'heure actuelle que les protéines sont essentiellement constituées de chaînes peptidiques dites fondamentales dans lesquelles les amino-acides sont liés les uns aux autres par leurs fonctions carboxyle et aminée. En plus de ces fonctions, chaque amino-acide naturel possède un ou plusieurs groupements caractéristiques qui émergent des chaînes peptidiques. Quand ces groupements appartiennent à des molécules organiques simples, ils leur confèrent un ensemble de propriétés bien définies que l'on retrouve sans grandes variations d'une molécule à l'autre. Dans les protéines, par contre, ces propriétés subissent souvent une atténuation notable que l'on tente d'expliquer, toutes les fois que cela est possible, par l'existence de diverses liaisons ou que l'on impute soit à l'organisation spatiale rigide de l'édifice protéique, soit au voisinage immédiat d'autres groupements.

Pour ces raisons déjà, l'étude de la "réactivité" des groupements protéiques, c'est-à-dire de leur comportement vis-à-vis des réactifs habituels de la chimie organique, présente une grande importance que d'autres considérations viennent encore renforcer.

Sur le plan pratique tout d'abord, on a souvent intérêt à modifier dans une direction précise les caractéristiques d'une protéine en agissant sur ses groupements libres. La connaissance préalable de leurs propriétés est alors indispensable.

Par ailleurs, on s'est depuis longtemps efforcé d'établir un lien entre la structure chimique et l'activité physiologique manifestée par certaines protéines. Un moyen particulièrement commode d'aborder cette étude consiste à traiter les protéines par un réactif soigneusement choisi et à observer les répercussions d'un tel traitement, d'une part, sur l'état de leurs groupements libres et, d'autre part, sur leur activité. Il est évidemment primordial à ce dernier point de vue que les réactions auxquelles sont soumises les protéines n'entraînent pas leur dénaturation. Malgré cette restriction, de nombreuses possibilités s'offrent au biochimiste comme en témoigne la revue d'ensemble récemment publiée par HERRIOTT¹.

Les réactions d'acylation ont toujours bénéficié cependant d'une faveur particulière due à leur douceur, à leur spécificité et à leur réversibilité et il faut noter que parmi les agents acylants, le cétène $\text{CH}_2 = \text{C} = \text{O}$ et l'isocyanate de phényle $\text{C}_6\text{H}_5\text{—N} = \text{C} = \text{O}$ sont les plus fréquemment employés. D'une part en effet, ils sont susceptibles d'exercer leur action en milieu aqueux, à froid et dans des conditions de p_{H} voisines de la neutralité. Leurs produits de transformation, d'autre part, peuvent être éliminés après réaction sans aucune difficulté.

Tout le monde semble convenir à l'heure actuelle que ces substances agissent principalement sur les groupements- NH_2 protéiques. On a noté cependant que, même dans les conditions optima de p_{H} (5.5–7.5 pour le cétène, 7.5–8.0, pour l'isocyanate de phényle),

la réaction est souvent incomplète et il serait intéressant de savoir à cet égard si les fonctions aminées apportées aux molécules protéiques par la lysine s'acylent à la même vitesse que celles des bouts de chaînes peptidiques.

Quoiqu'il en soit, si cette réaction est rapide, elle n'exerce la plupart du temps aucune influence notable sur l'activité physiologique des protéines. D'autres réactions plus lentes comme l'acylation des $-OH$ phénoliques, semblent par contre entraîner l'inactivation, mais on est alors amené à laisser les protéines étudiées pendant si longtemps au contact des réactifs que l'on peut craindre qu'elles subissent des transformations complexes d'ordre physique et chimique; les résultats d'expérience sont alors, sauf dans quelques cas bien particuliers, difficiles à interpréter.

Le rôle joué par les groupements thiols dans l'activité de certains ferments ("sulfhydryl enzymes" des Anglo-saxons) semble au contraire beaucoup plus net. Il est alors curieux de constater que l'on ne s'est pas beaucoup inquiété jusqu'ici de leur acylation par les réactifs précédemment mentionnés quoiqu'on sache² que le cétène acyle rapidement au soufre la cystéine et l'acide β thiol propionique. Peut-être, disposant déjà d'autres moyens d'action, a-t-on jugé superflu de l'étudier en détail.

Notons ici en effet que ces groupements sont susceptibles d'être oxydés ou bloqués par toute une série de réactifs dont on a tour à tour vanté la spécificité¹. Le cétène et l'isocyanate de phényle au contraire agissent, comme nous venons de le voir, sur les groupements aminés et phénoliques. Leur emploi ne paraît donc pas intéressant à moins que dans certaines conditions, ils acylent les groupements thiols beaucoup plus vite que les autres.

L'acylation des groupements $-SH$ protéiques a été récemment étudiée par FRAENKEL-CONRAT³ dans le cas particulier de l'albumine d'oeuf native. Traitée par le cétène, l'isocyanate de phényle et aussi le suboxyde de carbone, la protéine est graduellement coagulée. Après avoir éliminé le précipité, l'auteur détermine la teneur en $-SH$ de la portion restée soluble par mesure du pouvoir réducteur qu'elle exerce, en présence d'urée, sur le réactif de FOLIN. Il trouve alors que l'isocyanate de phényle agit bien sur les groupes $-SH$ un peu plus rapidement que sur les $-NH_2$, mais la différence est faible et la réaction incomplète. Quant au cétène, il acétylerait les $-SH$ moins vite que les $-NH_2$.

Ces résultats semblent de prime abord peu encourageants. Il faut toutefois remarquer que dans un travail de cet ordre, le choix comme matériel d'étude de l'albumine d'oeuf native paraît assez malheureux car les groupements thiols de cette protéine sont très peu "réactifs".

L'origine des variations que l'on peut constater dans la "réactivité" des groupes $-SH$ protéiques en fonction de l'état ou de la nature de la protéine étudiée, est encore bien obscure, malgré les nombreuses hypothèses émises à son sujet⁴. Certains de ces groupes sont très "réactifs" et se comportent, dans une certaine mesure, comme s'ils appartenaient à un mercaptan à bas poids moléculaire (groupes de la kératine, de l'albumine d'oeuf dénaturée par l'urée, la guanidine ou les détergents, groupes (a) de l'uréase). D'autres sont remarquablement "inertes" et ne sont pas accessibles à la plupart des réactifs classiques de la fonction thiol (groupes de l'albumine d'oeuf, de la sérumalbumine, de la globine de cheval natives etc.). D'autres enfin possèdent une "réactivité" comprise entre les deux limites précédentes comme, par exemple, ceux de l'albumine d'oeuf dénaturée par la chaleur, de l'uréase, de la myosine etc. . . On peut alors supposer a priori que, selon la protéine à laquelle on s'adresse, les groupes $-SH$ vont s'acyler à

des vitesses bien différentes et que FRAENKEL-CONRAT a étudié d'emblée l'un des cas les plus défavorables. Il nous a donc paru intéressant de reprendre ses expériences.

Dans une note préliminaire⁵, nous avons déjà signalé que, contrairement aux observations de l'auteur américain, le cétène n'agit pas du tout sur les -SH de l'albumine d'oeuf native. Mais si l'on disperse dans le dodécylsulfate de Na la fraction qui a précipité au cours de la réaction, on s'aperçoit que tous ses -SH sont acétylés. Nous avons alors supposé que la protéine précipitant à l'état dénaturé, possède des -SH fort "réactifs" qui s'acylent rapidement. Une expérience simple vient d'ailleurs confirmer cette hypothèse: Quand on fait barboter du cétène dans un mélange d'albumine et de dodécylsulfate de Na, on assiste à une acétylation presque instantanée des -SH. Comme on pouvait donc s'y attendre, la vitesse d'acylation de ces groupes dépend, dans une large mesure, de leur "réactivité".

Avant d'envisager les applications possibles de ces remarques dans le domaine des 'sulfhydryl enzymes' nous avons, au cours du présent travail, précisé à divers p_H nos expériences préliminaires et nous les avons étendues, d'une part, à l'isocyanate de phényle et, à titre de premier exemple d'autre part, à la kératine qui possède avant toute dénaturation, des -SH "réactifs".

I. PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATIÈRES PREMIÈRES ET TECHNIQUES UTILISÉES

1. Albumine d'oeuf

La préparation de cette protéine est classique et nous n'avons pas à y revenir. Signalons cependant que la teneur en -SH d'une solution d'albumine cristallisée présente, après un certain temps de séjour à la glacière, des variations brusques et inexplicables. Il est donc plus commode de sécher à l'air les cristaux de protéine imprégnés de sulfate d'ammonium et de les utiliser au fur et à mesure des besoins après dissolution et dialyse.

2. Kératine

Cette préparation a été faite selon GODDARD et MICHAELIS⁶ en dissolvant des cheveux humains dans une solution alcaline de CNK. Après précipitation par l'acide acétique et séchage, le produit obtenu est insoluble dans l'eau mais soluble dans les solutions neutres de phosphate. Il contient: 13,5 % d'N et 1,2 % de -SH (calculé en cystéine). Cette dernière teneur n'est pas augmentée par la présence de dodécylsulfate de Na.

3. Préparation du dodécylsulfate de Na

Les propriétés dénaturantes et solvantes que présentent les esters sulfuriques d'alcools gras vis-à-vis des protéines sont bien connues et ont donné lieu à d'intéressantes applications. Toutefois, on s'est contenté jusqu'ici, même dans les recherches de laboratoire, d'employer des préparations industrielles assez mal définies, vendues sous le nom de "Duponol".

Pensant qu'il serait préférable que chacun travaille avec un produit pur et standard, nous proposons l'emploi du dodécylsulfate de Na dont nous résumons ci-après la synthèse⁷: A une solution d'alcool laurique (0,5 mol) dans 125 ml de chloroforme, on ajoute goutte à goutte en agitant bien et en maintenant la température entre 0° et 5°, 0,55 mol de chlorhydrine sulfurique. On laisse le mélange revenir à 20° et on insuffle de l'air à sa surface, ce qui a pour effet d'éliminer l'acide chlorhydrique. On verse dans 300 ml d'eau glacée, neutralise à une température inférieure à 20° par de la soude concentrée (0,61 mol), évapore au bain marie bouillant jusqu'à consistance sirupeuse (en maintenant, si besoin est, la réaction alcaline par un peu de soude), puis on sèche sous vide. La poudre obtenue est ensuite lavée 3 fois par 500 ml d'acétone anhydre et épuisée à l'alcool absolu bouillant. Les extraits alcooliques une fois concentrés laissent cristalliser le dodécylsulfate par refroidissement.

4. Préparation du cétène

Le cétène est obtenu selon HERRIOT⁸ par pyrolyse de vapeurs d'acétone au contact d'un fil de tungstène chauffé électriquement. Le mélange gazeux, après avoir circulé dans un long réfrigérant ascendant et un piège maintenu à 0°, barbote dans la solution protéique à la vitesse de 1 bulle par seconde environ. Le cétène, comme l'indique FRAENKEL-CONRAT, peut aussi être dissous dans l'éther de pétrole froid. Une fois saturé, cet éther est réchauffé lentement et le gaz qui s'en échappe est envoyé

dans la solution protéique. Nous avons utilisé cette dernière technique, permettant un réglage beaucoup plus précis du débit, dans toutes les expériences de longue durée.

5. Dosage des groupes -SH

La détermination de ces groupes, basée jusqu'ici sur leurs propriétés réductrices, pose à l'analyste un problème que deux circonstances principales viennent compliquer :

a. Parallèlement à leur "réactivité" générale, le pouvoir réducteur de ces groupes varie beaucoup. Dans un travail comme le nôtre, où il s'agit de déterminer combien de -SH ont été acylés, nous avons évidemment intérêt à porter le pouvoir réducteur des groupes restés libres à une valeur standard aussi élevée que possible. Nous conduirons donc le dosage sur une dispersion de protéine dans un détergent.

b. Si, au sein d'un détergent, les groupes -SH protéiques sont fortement réducteurs, il ne faut pas oublier que d'autres groupes jouissent de façon plus ou moins accusée de la même propriété. On doit donc se tenir, par un choix judicieux de la nature de l'oxydant ainsi que des conditions de son emploi, à égale distance d'une oxydation trop douce n'atteignant pas la totalité des -SH et d'une oxydation trop brutale dépourvue de spécificité. La technique de MIRSKY⁹ et ANSON¹⁰ au ferricyanure nous a paru, après quelques modifications, satisfaisante à cet égard. Notre confiance en elle s'est d'ailleurs accrue pendant l'exécution de ce travail pour plusieurs raisons qui seront indiquées bientôt.

Nous résumons tout d'abord brièvement notre mode opératoire dans le cas simple de l'albumine d'oeuf non-traitée : a ml d'une solution contenant 10-20 mg de protéine (100-200 γ de "-SH") sont mélangés à (2.25 - a) ml d'eau, 0.05 ml de tampon phosphate M ($pH = 6.7$), 0.05 ml d'une solution fraîche de ferricyanure de K 0.1 M et 0.5 ml de dodécylsulfate de Na à 10 %. On laisse l'oxydation se dérouler 10 min à 37°, puis on transvase le mélange dans un ballon jaugé de 20 ml en lui ajoutant 0.4 ml de SO_4H_2 N. Après avoir complété au trait, on prélève 5 ml sur lesquels on dose colorimétriquement le ferrocyanure formé en le transformant en bleu de Prusse. A ce stade du dosage, une nouvelle addition de détergent permet de maintenir la protéine et le pigment à l'état dispersé; elle évite donc, d'une part, la précipitation préalable de la protéine par le tungstate de Na et, d'autre part, l'emploi bien peu pratique de gomme-gutte. Les 5 ml précédents sont donc mélangés à 0.1 ml de ferricyanure 0.1 M, 0.5 ml de dodécylsulfate à 10 %, 1 ml de sulfate ferrique** et 6.5 ml d'eau. On attend 5 min et on mesure au photocolorimètre l'intensité de la coloration bleue apparue (Filtre WRATTEN No. 27). Une courbe de référence est préalablement tracée en utilisant une solution dans le ferricyanure d'un échantillon de cystéine cristallisée de pureté connue.

Si l'échantillon d'albumine est insoluble dans l'eau, on le disperse, comme nous le verrons tout à l'heure, dans le dodécylsulfate. Quant à la kératine, elle est dissoute dans un tampon phosphate à $pH = 6.7$, oxydée par le ferricyanure puis précipitée par le tungstate de Na avant le dosage colorimétrique selon la méthode classique de MIRSKY.

6. Hydrolyse alcaline des liaisons S-acylées

Au cours de nos expériences, nous observons fréquemment que la teneur en -SH libres des protéines acylées est plus faible que celle des protéines initiales. Sommes-nous en présence d'une réelle acylation des groupements ou d'une simple oxydation? Pour fixer ce point, nous avons, comme FRAENKEL-CONRAT, cherché à tirer profit de l'instabilité en milieu alcalin des liaisons S-acylées susceptibles de s'être formées.

Signalons ici que, dans la plupart des cas, l'auteur américain semble pouvoir faire réapparaître quantitativement les -SH de ses préparations d'albumine acylée, en les maintenant quelques minutes dans la soude diluée. Les conditions expérimentales exactes qu'il convient d'utiliser ne sont d'ailleurs pas indiquées, car elles varient, paraît-il, suivant les cas. En dépit de nombreux efforts qu'il serait trop long de rapporter ici, nous n'avons pas pu arriver de façon régulière à des résultats aussi satisfaisants et nous attribuons cet échec à la destruction partielle des groupes thiols pendant l'hydrolyse. Quoiqu'il en soit, voici le mode opératoire auquel nous nous sommes finalement arrêtés : Une quantité convenable de protéine acylée est amenée à $pH = 11$ par de la soude 2N. On maintient 5 min à la température du laboratoire sous une atmosphère d'azote pur, puis on neutralise exactement par HCl 2N. Le volume total du mélange ne doit pas excéder à ce moment 2.25 ml et on procède immédiatement au dosage des groupes -SH comme il vient d'être indiqué.

7. Dosage des groupes -NH₂

Ces groupes ont été déterminés par la méthode classique de VAN SLYKE en introduisant la protéine dans l'appareil sous forme soit d'une solution aqueuse, soit d'une dispersion dans le dodécylsulfate de Na. On agite en présence d'alcool octylique 1/4 h à l'obscurité¹¹.

* Dans ce qui suit, les résultats de ces dosages seront calculés en cystéine et représentés par le symbole "-SH".

** On traite à l'ébullition 0.5 mg de sulfate ferrique anhydre par 17.5 ml de SO_4H_2 2N, puis on amène à 100 ml avec de l'eau et on filtre.

II. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A. ACTION DU CÉTÈNE ET DE L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE SUR L'ALBUMINE D'OEUF
NATIVE

Dans un mélange refroidi de 5 ml d'albumine à 3.25 % et 5 ml d'un tampon 2 M acétate ($p_H = 5.6$) ou phosphate ($p_H = 7.5$), on fait barboter pendant un temps déterminé du cétène provenant soit directement de l'appareil générateur, soit d'une solution dans l'éther de pétrole. Un autre échantillon de la solution protéique, tamponné comme précédemment et agité mécaniquement, est additionné lentement d'un poids d'isocyanate de phényle égal au poids de protéine en jeu. La vitesse d'addition est réglée pour que la totalité du réactif ait coulé au bout du temps prescrit. Dans les 2 cas, la protéine précipite peu à peu pendant l'opération soit seule (cas du cétène), soit mélangée à de la diphénylurée (cas de l'isocyanate de phényle).

Une fois ce traitement terminé, la liqueur est amenée à $p_H = 4.8$ afin d'assurer la précipitation complète de la fraction protéique dénaturée, puis elle est centrifugée. Le liquide clair est dialysé pendant 2-3 jours et centrifugé de nouveau. On détermine alors la quantité de protéine en solution par KJELDAHL et sa teneur en groupes $-SH$ et $-NH_2$ libres par les méthodes précédemment décrites. Le Tableau I donne les résultats de cette étude:

TABLEAU I

ACYLATION COMPARÉE PAR LE CÉTÈNE ET L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE DES GROUPEMENTS THIOLS ET AMINÉS DE L'ALBUMINE D'OEUF NATIVE

PH	Nature de l'agent acylant	Temps d'action (min)	"-SH" (%)		N-NH ₂ en % de N protéique total
			Avant hydrolyse alc.	Après hydrolyse alc.	
		0	1.00	—	4.1
5.6	Cétène	15	1.00	—	—
"	"	20	1.00	—	0.94
"	"	240	1.00	—	—
"	"	270	1.00	—	—
5.6	Isocyanate de phényle	45	0.85	—	—
"	"	90	0.60	—	3.90
"	"	180	0.42	0.78	3.90
7.5	Cétène	15	1.00	—	1.23
7.5	Isocyanate de phényle	90	0.48	1.00	1.20

Les résultats du Tableau I appellent les quelques remarques suivantes:

1. Les diverses préparations d'albumine obtenues au laboratoire présentent des teneurs en $-SH$ variant de 0.96 % à 1.20 %. Il semble que cette teneur soit d'autant plus forte que les cristallisations ont été menées plus rapidement. Dans un but de simplification nous avons ramené tous les chiffres du Tableau I à une teneur uniforme de 1.00 %.

2. Nos expériences montrent clairement que les groupes $-SH$ de l'albumine native ne sont pas acétylés par le cétène à $p_H = 5.6$ ou 7.5. Nous avons eu beau faire varier la

Bibliographie p. 504.

durée de cette acétylation et le p_H du milieu, nous avons toujours retrouvé dans la fraction restée soluble, une teneur en $-SH$ rigoureusement égale à la teneur initiale. Par contre, à ces deux p_H , l'acétylation des groupes $-NH_2$ se déroule selon le mode maintes fois décrit.

3. La plupart des réactifs caractéristiques de la fonction thiol (nitroprussiate, porphyrindine, o-iodosobenzoate etc. . .) impliquent la réunion de deux $-SH$ en une liaison disulfure. NEURATH a récemment supposé¹² que la configuration rigide de certaines protéines natives interdisait une telle réunion. Celle-ci serait au contraire possible dans une protéine dénaturée à structure plus flexible. Ainsi se trouveraient expliquées les variations dans la "réactivité" des groupes $-SH$ que l'on constate au moment de la dénaturation de certaines protéines.

Cette hypothèse demande évidemment que les substances s'unissant à un seul groupe thiol à la fois, réagissent de façon analogue, que la protéine soit native ou dénaturée. Or il ne semble pas que le mode d'action de l'acide monoiodacétique ou du p-chloromercuribenzoate vérifie bien cette dernière proposition. Quoiqu'il en soit, le comportement du cétène en montre définitivement le mal-fondé.

4. Si notre remarque² contredit nettement les observations de FRAENKEL-CONRAT, nos expériences avec l'isocyanate de phényle sont en bon accord avec les siennes. Nous trouvons en effet que le réactif agit lentement sur les $-SH$ de l'albumine native aux deux p_H où nous travaillons. Les groupes $-NH_2$ n'étant pas touchés en milieu acide, nous observons donc, à $p_H = 5,6$, l'acylation sélective des $-SH$ et, à $p_H = 7,5$, une acylation simultanée des $-SH$ et des $-NH_2$. L'isocyanate de phényle s'unit ainsi plus facilement que le cétène aux $-SH$ "inertes" de l'albumine native. Ce fait nous paraît assez remarquable car l'encombrement moléculaire plus réduit du cétène aurait pu a priori faire prévoir l'inverse.

B. ACTION DU CÉTÈNE ET DE L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE SUR L'ALBUMINE D'OEUF DÉNATURÉE

Nous avons déjà signalé dans l'introduction qu'un récent travail préliminaire nous a permis de constater l'acétylation extrêmement rapide des $-SH$ de l'albumine d'oeuf quand elle est dénaturée par précipitation ou par dispersion dans le dodécylsulfate de Na. Voici quelque détails sur notre mode opératoire :

La protéine qui précipite au cours du traitement au cétène est séparée par centrifugation, lavée soigneusement à l'eau et dispersée sous atmosphère d'azote dans du dodécylsulfate de Na à 10 %. De même, le précipité qui se forme pendant l'action de l'isocyanate de phényle sur la protéine, mélange de diphénylurée et de protéine insoluble, est extrait avec soin au moyen du détergent*. Dans les deux cas d'ailleurs, la protéine insoluble ne se disperse pas entièrement. Notons ici que la fraction dispersable, sur laquelle portent les dosages ultérieurs, est très probablement la moins acylée.

Dans une autre série d'expériences, 5 ml d'albumine sont additionnés de 1.1 ml de dodécylsulfate à 10 %, puis sont traités de la manière habituelle par le cétène ou l'isocyanate de phényle**. Après le traitement au cétène, la protéine est précipitée par addition de quelques gouttes d'acétate de Na, lavée par centrifugation et dispersée de nou-

* Nous avons vérifié que la diphénylurée est insoluble dans le dodécylsulfate à 10 %.

** Ces expériences sont conduites en milieu non-tamponné car en présence de dodécylsulfate, la protéine est précipitée par l'acétate ou le phosphate de Na.

veau dans le détergent. Après le traitement à l'isocyanate de phényle, la diphenylurée est centrifugée et la liqueur claire est utilisée directement pour les dosages habituels. Notons ici qu'en présence de dodécylsulfate de Na, la rupture des liaisons acylées semble procéder avec une lenteur anormale¹³. La réapparition des -SH en milieu alcalin ne pourra donc être que très partielle.

Voici d'ailleurs les résultats obtenus (Tableau II).

TABLEAU II
ACYLATION PAR LE CÉTÈNE ET L'ISOCYANATE DE PHÉNYLE DE L'ALBUMINE DÉNATURÉE

État de la protéine	pH	Nature de l'agent acylant	Temps d'action (min)	"-SH" %		N-NH ₂ % de N protéique total
				Avant hydrolyse alc.	Après hydrolyse alc.	
Précipitée en cours d'acylation	5.6	Cétène	25	0.00	—	—
	"	"	45	0.00	0.73	—
	"	Isocyanate	300	0.00	—	—
En dispersion dans le dodécylsulfate pendant l'acylation	5-4	Cétène	1	0.15	—	3.90
	"	"	5	0.00	0.73	—
	5-3	"	10	0.00	—	3.50
	5	Isocyanate	1	0.00	—	—
	"	"	15	0.00	—	3.950

Les résultats expérimentaux réunis dans le Tableau II montrent nettement que, dès qu'ils sont rendus "réactifs" par la dénaturation, les -SH de l'albumine sont presque instantanément acylés par le cétène et l'isocyanate de phényle. La réaction est si rapide que les groupes semblent même avoir plus d'affinité pour les deux agents acylants étudiés que des mercaptans à bas poids moléculaire comme la cystéine, le glutathion et l'acide β thiolpropionique. Il est de plus intéressant de constater qu'elle se produit en milieu acide, donc dans des conditions peu favorables à l'acylation des -NH₂. Nous assistons donc à une action tout-à-fait sélective des deux réactifs sur les -SH de la protéine.

C. ACTION DU CÉTÈNE SUR LES GROUPEMENTS THIOLS DE LA KÉRATÉINE

L'échantillon de kératine que nous avons préparé est insoluble à $p_H = 5.6$. Nous traitons donc au cétène une suspension de 150 mg de protéine dans 5 ml de tampon acétate. Après traitement, le p_H est ajusté à 4.6, la protéine est centrifugée, lavée à l'acide acétique dilué, puis dissoute dans un tampon phosphate M à $p_H = 6.7$. On dose sur cette solution l'azote total et les groupes -SH libres (Tableau III).

Les expériences décrites dans le Tableau III ont pour principal intérêt de montrer que, même en l'absence de dodécylsulfate, les -SH protéiques peuvent s'acyler très rapidement, pourvu qu'ils soient suffisamment "réactifs".

Au cours du présent travail nous avons étudié avec quelques détails le mode d'action du cétène et de l'isocyanate de phényle sur les groupes -SH protéiques dans deux cas que l'on peut à bon droit considérer comme extrêmes. Mais il faut noter que dans quelques ferments comme l'uréase et la myosine par exemple, il existe toute une série de -SH possédant des "réactivités" intermédiaires. On peut donc espérer, par l'emploi

TABLEAU III
ACÉTYLATION PAR LE CÉTÈNE DES GROUPES THIOLS DE LA
KÉRATÉINE

Toutes les acétylations ont été conduites à pH = 5.6

Temps d'acétylation (min)	"-SH" %	
	Avant hydrolyse alcaline	Après hydrolyse alcaline
0	1.20	—
1	0.29	1.14
2	0.26	1.24
5	0.00	0.81

judicieux des deux réactifs, bloquer certains groupes de préférence aux autres et juger ainsi, comme vient de le faire HELLERMAN pour l'uréase¹⁴, de leur importance relative dans l'activité physiologique déployée par ces protéines.

RÉSUMÉ

Cette étude sur l'acylation des groupes -SH protéiques a permis de dégager les points suivants :

1. Les groupes -SH "inertes" de l'albumine d'oeuf native ne sont pas touchés par le cétène, mais ils sont par contre accessibles à l'isocyanate de phényle. Quoique lente, l'action de ce dernier réactif est sélective, pourvu que le pH du milieu soit maintenu légèrement acide.

2. Les groupes -SH "réactifs" de l'albumine dénaturée ou de la kératine possèdent une affinité extrême pour le cétène et l'isocyanate de phényle. Il en résulte que, dans un large intervalle de pH, l'acylation de ces groupes est beaucoup plus rapide que celle des groupes aminés.

SUMMARY

This study of the acylation of protein SH-groups has led to the following conclusions:

1. The "inert" SH-groups of native egg albumin are not attacked by keten, but they are accessible to phenyl isocyanate. Though slow, the action of the latter reagent is selective provided the pH of the medium is kept slightly acid.

2. The "reactive" SH-groups of denatured albumin or of keratine have an extreme affinity for keten and phenyl isocyanate, with the result that, over a considerable range of pH, acylation of these groups is much more rapid than that of the amino groups.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit über die SH-Gruppen von Eiweiss erlaubt folgende Schlussfolgerungen:

1. Die "inerten" SH-Gruppen des nativen Ei-albumins werden von Ceten nicht angegriffen, dagegen sind sie wohl für Phenylisocyanat zugänglich. Die Wirkung des letzteren Reagens ist selektiv, wie langsam sie auch sein möge, vorausgesetzt, dass der pH des Milieus leicht sauer gehalten wird.

2. Die "reaktiven" SH-Gruppen des denaturierten Albumins oder des Keratins besitzen eine äusserst grosse Affinität für Ceten und Phenylisocyanat. Hieraus folgt, dass innerhalb eines breiten pH-Bereiches die Acylierung dieser Gruppen viel schneller verläuft als die von Aminogruppen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. M. HERRIOTT, *Advances in Protein Chemistry*, 1946, tome III.
- ² A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1452.
- ³ H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 385.
H. FRAENKEL-CONRAT, M. COOPER et H. OLCOTT, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 314.
- ⁴ H. NEURATH, J. P. GREENSTEIN, F. W. PUTNAM et J. O. ERICKSON, *Chem. Rev.*, 34 (1944) 157.
- ⁵ P. DESNUELLE et M. ROVERY, *Compt. rend.*, 224 (1947) 235.

- ⁶ D. R. GODDARD et L. MICHAELIS, *J. Biol. Chem.*, 106 (1934) 605.
- ⁷ G. DESSEIGNE, *Corps Gras*, 1 (1945) 136.
- ⁸ R. M. HERRIOTT, *J. gen. Physiol.*, 18 (1935) 69.
- ⁹ A. E. MIRSKY, *J. gen. Physiol.*, 24 (1941) 725.
- ¹⁰ M. L. ANSON, *J. gen. Physiol.*, 24 (1941) 399.
- ¹¹ H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 453.
- ¹² H. NEURATH, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 6 (1938) 196.
- ¹³ G. L. MILLER, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 339.
- ¹⁴ L. HELLERMAN, F. P. CHINARD et V. R. DEITZ, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 443.

Reçu le 14 août 1947