

# SUR LA MOINDRE RÉSISTANCE A L'HYDROLYSE ACIDE DES LIAISONS PEPTIDIQUES SITUÉES A CÔTÉ D'UNE FONCTION HYDROXYLE

par

P. DESNUELLE ET A. CASAL

*Laboratoire de chimie biologique. Faculté des Sciences, Marseille (France)*

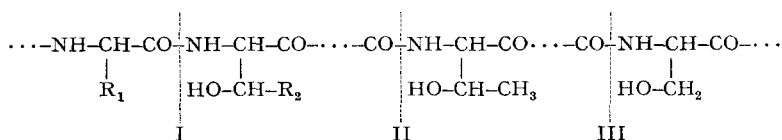
Il est bien connu en chimie organique que si les liaisons O- et S-acylées sont fort sensibles aux agents d'hydrolyse, les liaisons N-acylées des amides substitués — parmi lesquelles il faut ranger les liaisons peptidiques — sont généralement stables à leur contact. L'hydrolyse des protéines est donc un phénomène lent qui, à l'échelle moléculaire, doit être regardé comme une suite de ruptures élémentaires échelonnées dans le temps. Ces ruptures, on peut en connaître le nombre à chaque instant grâce aux fonctions amine qu'elles font apparaître. Mais leur succession dans la molécule protéique est-elle uniquement réglée par les lois du hasard ou suit-elle au contraire un ordre défini? En d'autres termes, les liaisons peptidiques d'une protéine opposent-elles toutes la même résistance à l'hydrolyse ou bien certaines cèdent-elles plus vite que d'autres? Tel est le problème encore peu étudié qu'il nous a paru intéressant d'aborder.

Disons tout de suite que le comportement des peptides vient à l'appui de notre deuxième hypothèse. On sait en effet que les dipeptides sont généralement plus difficiles à hydrolyser que leurs homologues supérieurs. Les dipeptides de la valine en particulier sont très résistants et leur présence dans des hydrolysats soi-disant totaux a été maintes fois signalée. La stabilité des liaisons peptidiques semble donc ainsi dépendre des dimensions de la molécule dont elles font partie et, dans certains cas aussi, de la nature des amino-acides qu'elles relient.

Un récent travail de GORDON, MARTIN et SYNGE<sup>1</sup> paraît d'ailleurs confirmer cette dernière proposition dans le domaine des protéines elles-mêmes. Maintenant à 37° de la laine dans HCl concentré, ces auteurs déterminent à intervalles réguliers:

1. L'azote aminé apparu qui leur indique le nombre total des liaisons rompues donc la stabilité moyenne de ces liaisons.

2. L'ammoniaque et l'acétaldéhyde prenant naissance par oxydation periodique de l'hydrolysate. La formation de la base est, comme on le sait, caractéristique des  $\alpha$  oxyamines. Elle permet donc de mesurer la stabilité des liaisons (I) dans lesquelles un amino-acide hydroxylé (thréonine (II) ou sérine (III)) se trouve impliqué par l'intermédiaire de sa fonction amine. La stabilité des liaisons de la thréonine (type II) est donné directement par le dosage de l'acétaldéhyde.



Les résultats expérimentaux obtenus semblent alors indiquer que la stabilité des liaisons (I) et (II) est nettement inférieure à la stabilité moyenne des liaisons peptidiques de la protéine.

Il nous a paru tout d'abord utile non seulement d'étendre cette étude à d'autres protéines que la laine mais d'en préciser aussi quelques côtés encore incertains. Les courbes établies par les auteurs anglais semblent en effet indiquer que les liaisons (II) de la thréonine s'hydrolysent plus vite que l'ensemble des liaisons (I). Ce fait, s'il était exact, prouverait que les liaisons (III) de la sérine sont douées d'une plus grande stabilité que celles de la thréonine. Nous verrons par la suite qu'il n'en est rien. Des techniques analytiques précises mises en oeuvre sur des hydrolysats chlorhydriques partiels de caséine, d'albumine d'oeuf cristallisée, de fibroïne de la soie et d'insuline montrent clairement que les liaisons (II) et (III) se comportent de façon identique. Le voisinage immédiat d'une fonction hydroxy apparaît alors comme la seule cause de leur remarquable labilité.

Il est à noter cependant que l'attention s'est tout d'abord portée sur les liaisons (I) des protéines non parce qu'un indice quelconque les faisait paraître a priori spécialement instables mais bien parce que l'oxydation périodique permettait, de manière toute fortuite, d'en suivre commodément la rupture. Quant aux autres liaisons, nous n'en connaissons que la stabilité moyenne. Il n'est donc pas exclu que certaines d'entre elles s'hydrolysent aussi vite que les liaisons (I) et peut-être même plus vite encore. Pour fixer ce point important, il est évidemment nécessaire de faire appel à une technique générale permettant d'identifier toutes les fonctions  $-NH_2$  d'une protéine partiellement hydrolysée, que ces fonctions soient situées ou non en  $\alpha$  d'un groupe  $-OH$ . Aucune ne nous a paru meilleure que celle utilisée récemment par SANGER<sup>2</sup> dans son étude des amino-acides situés à l'extrémité aminée des chaînes peptidiques de l'insuline. Que les chaînes soient en effet préformées dans une molécule protéique intacte ou qu'elles apparaissent au début de son hydrolyse, le problème est le même et doit pouvoir être résolu par des moyens identiques.

Rappelons brièvement que cette technique consiste à condenser les fonctions aminées des chaînes peptidiques avec du dinitrofluorobenzène (DNFB). On hydrolyse ensuite le produit de condensation et on sépare les dinitrophényl (DNP)-amino-acides formés, par chromatographie de partage sur gel de silice. Malgré certaines restrictions que nous discuterons plus tard, la méthode nous a permis de montrer qu'en milieu acide concentré, aucune liaison peptidique ne semble aussi instable que les liaisons (I).

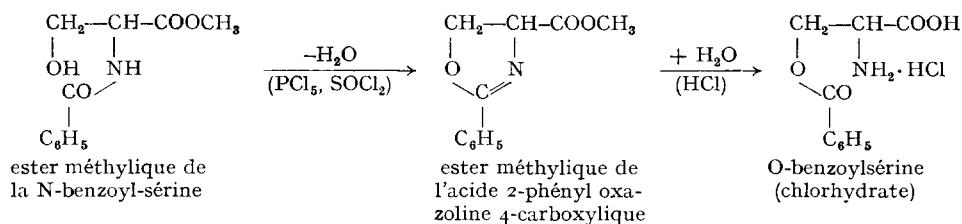
Il en résulte que parmi tous les groupements libres d'une molécule protéique, les groupes  $-OH$  exercent seuls un effet labilisateur notable sur les liaisons peptidiques situées à leur proximité immédiate. Le mécanisme chimique de cet effet mérite donc d'être étudié, et dans ce domaine encore, la technique de SANGER nous a paru devoir jeter quelques lumières.

On peut supposer en effet que l'hydrolyse préférentielle des liaisons (I) résulte d'une migration préalable des chaînes acylées de l'azote sur l'oxygène, migration analogue à celles observées pour la première fois par BERGMANN sur des molécules plus simples comme les  $\alpha\alpha'$  ON-diacylaminopropanediols<sup>3</sup>, l'acide  $\gamma$  benzoylamino  $\beta$  oxybutyrique<sup>4</sup>, l'ester méthylique de la N-benzoylsérine et la glycylsérine<sup>5</sup>. D'après cet auteur, le phénomène se déroule en deux temps principaux :

1. Cyclisation de la molécule en une oxazoline substituée sous l'influence de substances déshydratantes et chlorurantes comme le pentachlorure de phosphore ou le chlorure de thionyle.

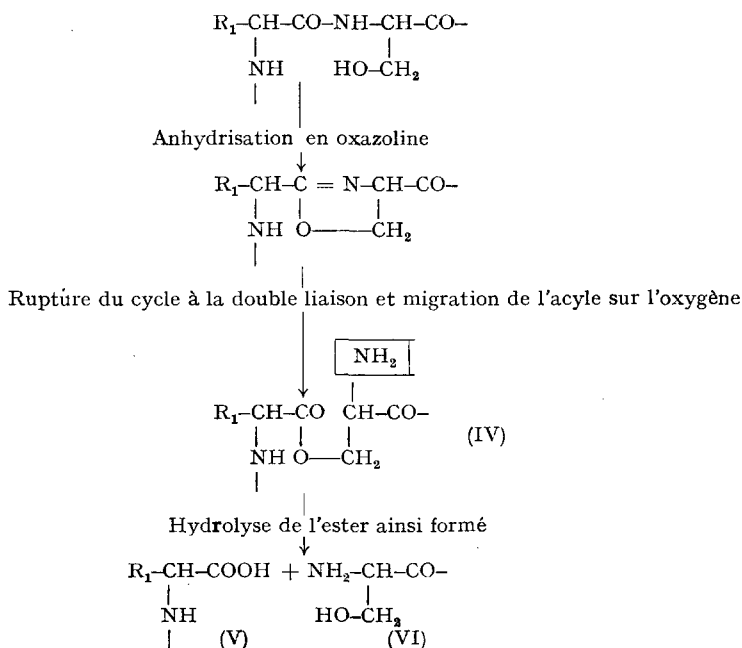
2. Ouverture par un acide dilué du noyau oxazoline entre l'un de ses carbones et l'azote.

Ce processus peut, dans le cas de l'ester méthylique de la N-benzoyl-sérine, se formuler ainsi :



D'un amide substitué stable analogue à un peptide, il conduit donc à un ester facilement hydrolysable. Notons cependant qu'il est beaucoup moins simple avec un véritable peptide comme la glycyl- ou l'alanyl-sérine. Le déshydratant produit alors en effet une double anhydrisation : l'une analogue à la précédente, entre la fonction  $\text{-OH}$  de la sérine et le groupe  $\text{CO}$  de la liaison et l'autre, entre les fonctions  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  du peptide. La substance ainsi formée, mise au contact d' $\text{HCl}$  dilué perd rapidement son azote sérrique et se transforme en un produit de condensation de la glycine (ou de l'alanine) et de l'acide pyruvique. Il n'est toutefois pas interdit de penser que le comportement spécial de cette substance soit dû à sa structure deux fois cyclisée.

On peut donc imaginer que la sélectivité d'hydrolyse des liaisons (I) trouve son origine dans une série de réactions analogues aux précédentes et provoquées par l'acide chlorhydrique concentré au sein des protéines. Ces réactions se dérouleraient au niveau de toutes les liaisons (I) et pourraient se schématiser comme suit dans le cas des liaisons (III) de la sérine :



Rappelons ici d'ailleurs que la formation possible de cycles oxazoline au niveau

des liaisons (I) protéiques a déjà été envisagée par BLACKBURN<sup>6</sup> dans son étude de la O-méthylation de la laine par le sulfate ou le bromure de méthyle. Quoiqu'il en soit, il est évident que la complexité des molécules protéiques interdit à l'heure actuelle la vérification directe de l'hypothèse précédente. Supposons toutefois que, comme dans les expériences de BERGMANN, les esters intermédiaires (IV) s'hydrolysent moins vite qu'ils ne se forment. Leur présence dans le milieu est alors susceptible d'être décelée grâce à la fonction aminée qu'ils portent. Déterminons en effet sur une protéine partiellement hydrolysée :

a. la quantité d'aldéhyde (formol dans l'exemple choisi) prenant naissance par oxydation périodique. On en déduira le nombre de molécules (VI) ;

b. la quantité de DNP-hydroxyaminoacide (DNP-sérine dans l'exemple choisi) susceptible d'être isolée par la technique de SANGER. Ce dérivé peut s'être formé à partir des esters (IV) aussi bien que des molécules (VI). La technique précédente donnera donc la somme (IV + VI).

Si, rapportée à la même base, la seconde de ces déterminations conduit à un résultat plus fort que la première, l'existence même des esters (IV) se trouve démontrée et la validité de l'ensemble du schéma devient probable.

On trouvera dans la deuxième partie de ce travail les résultats expérimentaux obtenus à cet égard sur l'albumine d'oeuf, la fibroïne et l'insuline partiellement hydrolysées.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### I. ÉTUDE PAR OXYDATION PERIODIQUE DE L'HYDROLYSE DES LIAISONS (I)

L'oxydation des  $\alpha$  oxyamines par les ions periodiques est maintenant bien connue<sup>7</sup>. Rappelons toutefois qu'elle a lieu seulement dans le cas où les 2 fonctions  $-OH$  et  $-NH_2$  de ces molécules sont dépourvues de tout substituant. Pour que les édifices protéiques présentent une telle structure, il faut, soit qu'ils contiennent de l'hydroxylysine, soit qu'une de leurs chaînes peptidiques porte à son extrémité aminée un reste de sérine ou de thréonine. Ces deux conditions sont, comme nous l'avons vu au cours d'un récent travail<sup>8</sup>, rarement réalisées dans les protéines intactes. Mais, dès qu'une liaison (I) est rompue par hydrolyse, une chaîne peptidique  $\alpha$  oxyaminée apparaît dans le milieu. L'oxydation periodique de cette dernière donnera alors naissance à des substances caractéristiques (ammoniaque, formol et acétaldéhyde) susceptibles d'être aisément dosées.

L'hydrolyse de la caséine a été réalisée à l'aide soit d'HCl 2.5 N à l'ébullition soit d'HCl 10 N à 37° ou 30°. La fibroïne de son côté, a été hydrolysée dans HCl 10 N à 30°. Des échantillons successifs ont été prélevés dans chaque cas et, après élimination d'HCl par évaporation rapide à froid sous un vide poussé, l'azote aminé total a été déterminé sur chacun d'eux par la technique de VAN SLYKE modifiée<sup>9</sup>. Par ailleurs, nous avons soumis ces échantillons à l'oxydation periodique dans nos conditions habituelles<sup>10</sup> et avons déterminé l'ammoniaque par microdiffusion suivie de dosage alcalimétrique<sup>11</sup>, le formol par colorimétrie<sup>10</sup> et l'acétaldéhyde par colorimétrie<sup>12</sup> et microdiffusion<sup>13</sup>.

\* Ces conditions provoquent, on le sait, l'oxydation totale de la sérine et de la thréonine. En est-il de même avec les longues chaînes peptidiques  $\alpha$  oxyaminées ? Il est évidemment impossible de le vérifier de façon directe, mais nous verrons par la suite que rien ne permet jusqu'ici d'en douter.

Pour obtenir une image aussi fidèle que possible de la stabilité moyenne des liaisons peptidiques autres que les liaisons (I), nous avons retranché chaque fois des résultats du dosage VAN SLYKE l'azote aminé provenant de la rupture des liaisons (I) et celui dû à la présence d'ammoniaque dans les hydrolysats. De plus, nous avons cherché à tenir compte de l'hydrolyse des liaisons de la proline que le dosage VAN SLYKE ne révèle pas. Dans ce but, nous avons supposé en première approximation que ces liaisons s'hydrolysent à la même vitesse que les autres et avons ajouté aux résultats précédents un certain facteur calculé au prorata de la teneur en proline des protéines étudiées. Attribuant alors la valeur 100 aux chiffres fournis par les techniques précédentes quand elles sont appliquées à des hydrolysats totaux (20 h dans HCl à 20 % bouillant), nous avons tracé dans les figures 1 à 4 la cinétique des divers phénomènes que nous désirions suivre.

De l'examen des figures 1 à 4 il ressort que :

1. Quand on hydrolyse à chaud de la caséine par HCl dilué, les liaisons (I) des hydroxyaminoacides possèdent bien une stabilité moindre que l'ensemble des autres liaisons mais la différence est peu accusée.

2. Elle s'affirme par contre de façon remarquablement nette dès qu'on traite les protéines par HCl concentré à 37° et, mieux encore, à 30°. Au bout de 36 h à 30°, par exemple, HCl 10 N a rompu 80 % environ des liaisons (I) de la fibroïne et 25 % seulement des autres liaisons.

3. Le phénomène signalé pour la laine par GORDON *et coll.* est donc confirmé dans son ensemble. Toutefois des techniques analytiques plus précises nous montrent que les liaisons (III) (sérine) se comportent à l'hydrolyse comme les liaisons (II) (thrénine).

4. Il serait évidemment intéressant de savoir si ces liaisons (I) sont également labiles en milieu basique. La dégradation extrêmement rapide des acides hydroxyaminés pendant l'hydrolyse alcaline nous a cependant interdit d'entreprendre des essais dans ce sens.

5. Nous avons enfin profité de ces expériences pour faire quelques observations d'un autre ordre :

La formation d'ammoniaque est, comme on le voit, très intense au début de l'hydrolyse, puis elle ralentit brusquement en général, mais se poursuit néanmoins jusqu'à la fin. On pourrait évidemment penser que la phase initiale rapide correspond à l'hydrolyse de la glutamine et de l'asparagine contenues dans les protéines et que la deuxième phase plus lente traduise une désamination progressive des amino-acides de l'hydrolysats. Cette désamination est, on le sait, particulièrement importante pour les amino-acides  $\beta$  hydroxylés et les variations que l'on observe, suivant les conditions d'hydrolyse, dans les quantités maxima d'aldéhydes susceptibles d'être dosées, confirme bien ce fait. Pour en tenir compte, REES<sup>14</sup> a mesuré la désamination de la sérine et de la thrénine dans les conditions mêmes de ses hydrolyses acides et il a corrigé systématiquement tous ses résultats d'analyse de 11.7 et 5.5 % respectivement. Mais il convient de se demander si l'ammoniaque qui apparaît au début de l'hydrolyse ne provient pas elle aussi en partie de la désamination des acides hydroxylés au moment même de la rupture des liaisons (I), rupture qui se déroule à ce moment à un rythme particulièrement rapide. Les corrections de REES seraient alors insuffisantes et les valeurs attribuées jusqu'ici aux teneurs des protéines tant en hydroxyaminoacides qu'en "N-amide" devraient être considérées comme inexactes.

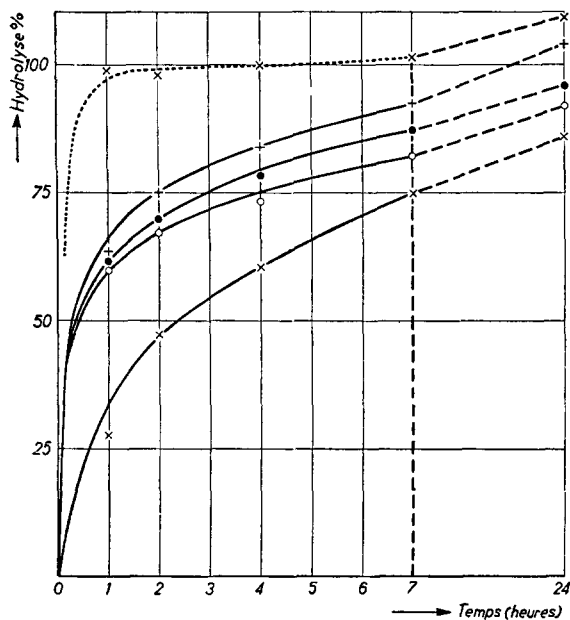


Fig. 1. Hydrolyse de la caséine par HCl 2.5 N à l'ébullition.

× —× N-NH<sub>2</sub> corrigé (voir texte);  
 ● —● N-hydroxyamino-acides totaux;  
 ○ —○ N-sérine;  
 + —+ N-thréonine;  
 × —× N-NH<sub>3</sub>

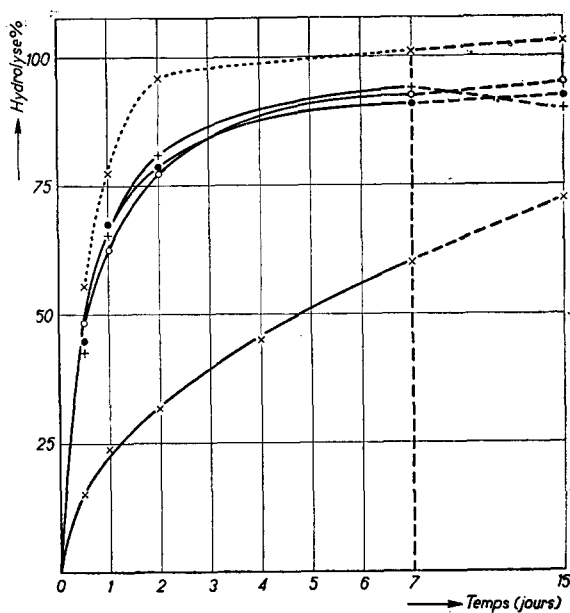


Fig. 2. Hydrolyse de la caséine par HCl 10 N à 37° (mêmes conventions qu'à la figure 1)

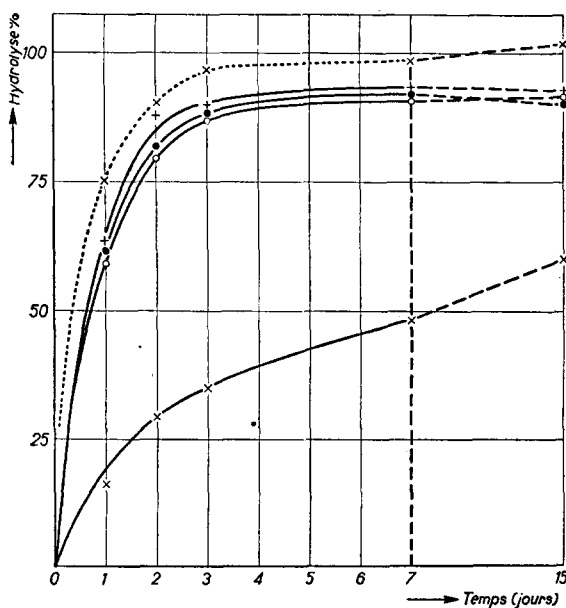


Fig. 3. Hydrolyse de la caséine par HCl 10 N à 30° (mêmes conventions qu'à la figure 1)

Bibliographie p. 75.

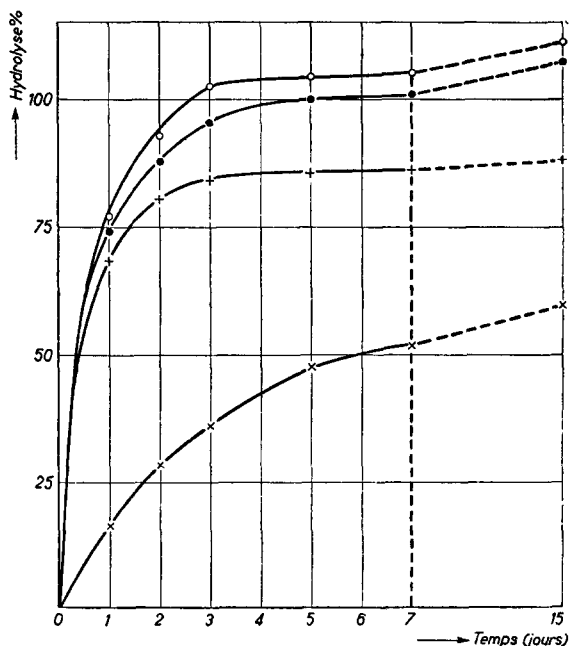


Fig. 4. Hydrolyse de la fibroïne de la soie par HCl 10 N à 30° (mêmes conventions qu'à la figure 1)

## II. APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE SANGER A UN HYDROLYSAT PROTÉIQUE PARTIEL

Dans un petit ballon rodé de 10 ml, on dissout 25 mg (poids sec) d'albumine d'oeuf cristallisée ou de fibroïne de la soie dans 1 ml d'HCl 10 N. Après 1 h à 30°, on chasse HCl sous vide poussé et on reprend le résidu sec par 1 ml d'eau. Si la protéine précipite à cet instant, les grumeaux sont divisés aussi bien que possible à l'aide d'une petite baguette de verre. On ajoute alors un excès de  $\text{NaHCO}_3$  solide, 2 ml d'alcool à 95° et 6 gouttes de DNFB\*. On agite vivement pendant 2 h et, après avoir extrait à l'éther l'excès de DNFB, on hydrolyse 20 h dans HCl 20 % bouillant. Le mélange des DNP-aminoacides ainsi obtenu est alors séparé en deux fractions: l'une éthérosoluble et l'autre hydrosoluble. Dans ce but, l'hydrolysat une fois étendu est extrait 3 fois à l'éther et cet éther est lavé 2 fois par un peu d'eau\*\*. La fraction éthérosoluble est analysée successivement sur une colonne 1 % butanol-chloroforme et une colonne de chloroforme. Quant à la fraction hydrosoluble, une partie aliquote en est analysée sur une série de colonnes dont on trouvera le détail plus loin.

Des essais d'orientation nous ont montré qu'en présence d'un mélange 1 % butanol-chloroforme, le gel de silice utilisé permet de séparer facilement la DNP-sérine ( $R = 0.15$ ) de la DNP-thréonine ( $R = 0.25$ ). Par contre, la DNP-thréonine ne peut être distinguée de la DNP-oxypoline. Ce fait est de peu d'importance car les protéines étudiées ne contiennent pas d'oxypoline. Quant au DNP-acide aspartique ( $R = 0.05$ ) et à la DNP-tyrosine ( $R = 0.5$ ), leur vitesse de migration est bien différente de celle des DNP-aminoacides hydroxylés. Par ailleurs, dans le but de connaître avec quel rendement s'effectue, dans nos conditions expérimentales, la récupération de la DNP-sérine et de la DNP-thréonine, nous avons traité par DNFB un mélange d'acides-amino contenant des proportions connues de sérine et de thréonine pure. Puis, après avoir extrait le DNFB en excès, nous avons ajouté 25 mg d'albumine et soumis le tout à une hydrolyse de 20 h dans HCl 20 % bouillant. Nous avons pu ainsi retrouver 70 % de la sérine mise en jeu et 82 % de la thréonine.

## A. Cas de l'albumine d'oeuf cristallisée

Le passage de la fraction éthérosoluble sur une colonne 1 % butanol-chloroforme permet de séparer une certaine quantité de substances rapides ( $R > 1$ ) et une grosse bande lente. Celle-ci se divise bientôt en deux parties d'inégale importance ( $R$  respectivement égal à 0.15 et 0.25). Leur vitesse de migration permet donc d'identifier leur contenu à la DNP-sérine et la DNP-thréonine. A la partie supérieure de la colonne, reste une bande à peine visible ( $R = 0.05$ ) qui est négligée.

Les dérivés de la sérine et de la thréonine sont élués séparément, puis ils sont dissous dans  $\text{NaHCO}_3$  1 % et dosés colorimétriquement:

	Sérine	Thréonine
Poids de l'acide-amino en mg calculé à partir du poids corrigé de DNP-dérivé (p)	0.533	0.276
Poids total de l'acide-amino en mg contenu dans 25 mg de la protéine (P) . . .	2.132	1.045
p/P (%) . . . . .	25.0	26.5

\* Dorénavant, nous nous servons des abréviations et notations utilisées par SANGER dans son travail original<sup>2</sup>.

\*\* Nous avons en effet remarqué que la DNP-sérine et la DNP-thréonine sont susceptibles d'être partiellement extraites par l'eau de leur solution étherée.

Passées sur colonne de chloroforme, les substances rapides précédentes donnent naissance à une nouvelle bande rapide (nitraniline) qui est rejetée et à une large zone (R du front supérieur 0.17; R du front inférieur: 0.65). Cette dernière est évidemment constituée par un mélange de tous les DNP-amino-acides éthersolubles autres que la DNP-sérine et la DNP-thréonine. Aucun des constituants de ce mélange n'est toutefois en proportions suffisantes pour former une bande nette. Après élution, l'ensemble de la zone développe dans  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1 % une coloration moins intense que la DNP-thréonine précédemment isolée.

La fraction hydrosoluble de son côté est analysée successivement sur des colonnes de chloroforme, 66 % méthyléthylcétone-éther et 17 % butanol-chloroforme. Elle renferme, comme on doit s'y attendre, de l' $\epsilon$  mono DNP-lysine mais des traces seulement de DNP-arginine et de DNP-histidine.

Enfin, une opération témoin identique effectuée sur 300 mg d'albumine d'oeuf intacte ne nous a pas permis d'isoler un seul DNP-amino-acide en quantités notables, sauf évidemment l' $\epsilon$  mono DNP-lysine.

### B. Cas de la fibroïne de la soie et de l'insuline

Des expériences analogues à la précédente ont été conduites sur 25 mg (poids sec) de fibroïne et d'insuline; elles ont donné, en ce qui concerne les hydroxyamino-acides, les résultats suivants:

	Fibroïne		Insuline	
	Sérine	Thréonine	Sérine	Thréonine
p	0.636	0.119	0.276	—
P	3.313	0.502	1.300	—
p/P (%)	19.2	23.7	21.2	*

\* Essai perdu.

Les DNP-sérine et DNP-thréonine une fois séparées, le reste de la fraction éthersoluble et la fraction hydrosoluble ont été analysés comme précédemment. Dans le cas de l'insuline, nous avons retrouvé uniquement les bandes décrites par SANGER au cours de son étude de la protéine intacte. Quant à la fibroïne, sa fraction éthersoluble donne sur colonne de chloroforme une large zone analogue à celle trouvée dans le cas de l'albumine. Mais en plus, on peut observer une ou deux bandes assez bien individualisées. Nous n'avons pas d'ailleurs entrepris encore une étude précise de ces bandes.

Les résultats expérimentaux précédents pris dans leur ensemble permettent de tirer les conclusions suivantes:

1. En parfait accord avec l'oxydation périodique, la technique de SANGER met directement en évidence l'instabilité des liaisons (I) dans HCl concentré.

2. Elle nous apprend de plus que la plupart des autres liaisons sont beaucoup plus stables que les liaisons (I). L'étude détaillée que nous avons entreprise sur l'albumine d'oeuf est à cet égard particulièrement instructive. La fraction éthersoluble des DNP aminoacides fournie par cette protéine est en effet susceptible en principe de contenir quatorze dérivés différents. En fait, elle ne contient que la DNP-sérine et la DNP-thréonine en quantités notables et les douze autres constituants ne s'y trouvent qu'à l'état de traces. Quoiqu'ils proviennent d'aminoacides formant 65 % de la protéine en-



viron, leur quantité totale est inférieure à celle de la DNP-thréonine (teneur de la protéine en thréonine: 4 %). Par ailleurs, l'analyse de la fraction hydrosoluble confirme pleinement ces résultats.

3. Il faut se rappeler toutefois que la DNP-glycine et surtout la DNP-proline sont rapidement hydrolysées par HCl 20 % à l'ébullition. Toute conclusion concernant ces acides doit donc être provisoirement réservée. La vitesse d'hydrolyse des liaisons de la proline devra en particulier faire l'objet de nouvelles recherches.

4. Le destin des liaisons de la cystéine n'a pas non plus été éclairci. Les NS-diDNP-cystéine et N-monoDNP-cystéine n'ont pas en effet été préparées jusqu'ici et leur comportement à la chromatographie de partage n'est pas connu. Il n'est pas interdit de penser toutefois que la fonction  $-SH$  souvent si semblable à la fonction  $-OH$ , labilise comme cette dernière les liaisons peptidiques.

5. Nos expériences, quoiqu'elles n'aient pas été spécialement dirigées dans ce sens, fournissent enfin quelques renseignements préliminaires sur les groupements aminés libres de l'albumine d'oeuf cristallisée et de la fibroïne de la soie intactes. Dans les limites imposées par les remarques 3 et 4, il est permis de dire qu'elles n'ont pas décelées la présence de bouts de chaînes peptidiques dans l'albumine d'oeuf. Ce fait nous paraît assez remarquable car, d'une part, l'albumine livre au dosage VAN SLYKE plus d'azote aminé que sa teneur en lysine ne peut laisser prévoir<sup>15</sup> et, d'autre part, son spectre de rayons-X révèle la présence de quatre plans superposés<sup>16</sup>. Il faudrait alors supposer que le polysaccharide de cette protéine<sup>17</sup> soit le vecteur des fonctions  $NH_2$  supplémentaires et que les chaînes peptidiques, si elles existent, n'en possèdent point.

Quant à la fibroïne, sa structure si particulière rendrait intéressante toute étude précise de ses groupes aminés éventuels.

### III. SUR LE MÉCANISME DE LABILISATION DES LIAISONS DE TYPE (I)

Les expériences décrites jusqu'ici montrent que la proximité d'une fonction hydroxyle diminue considérablement la résistance des liaisons peptidiques envers HCl concentré. Pour tenter d'expliquer cet effet labilisateur, nous avons proposé au début de ce travail un schéma prévoyant la formation intermédiaire d'esters (IV). Cette formation deviendrait probable, avons-nous indiqué, si l'on pouvait montrer que les protéines partiellement hydrolysées contiennent plus de groupes  $-NH_2$  sériques qu'elles ne livrent de molécules de formol à l'oxydation periodique.

Le premier terme de cette comparaison est déjà connu grâce à nos expériences précédentes. Afin de déterminer le deuxième, nous avons maintenu 1 h dans HCl 10 N à 30°, de l'albumine d'oeuf cristallisée, de la fibroïne et de l'insuline. Après évaporation ou neutralisation de l'acide à froid, nous avons oxydé le milieu par le periodate de Na. Il faut d'ailleurs signaler ici que l'albumine d'oeuf ainsi traitée n'est pas soluble en milieu neutre. On pourrait alors craindre que l'oxydation qui doit être conduite sur une suspension à la machine à agiter, ne soit pas quantitative dans ces conditions. Il n'en est probablement rien cependant car nous avons vérifié que les quantités de formol libérées sont les mêmes après une agitation de 20, 30 ou 60 minutes.

Voici d'ailleurs nos résultats expérimentaux (Tableau I).

Malgré des incertitudes expérimentales dont nous ne nous dissimulons pas l'importance, les résultats du tableau I s'inscrivent nettement en faveur de l'existence des esters intermédiaires (IV). Les courbes des fig. 1 à 4 relatives à l'ammoniaque, au formol et

à l'acétaldéhyde seraient alors la représentation graphique en fonction du temps de l'hydrolyse de ces esters. Les courbes relatives à l'azote aminé représenteraient par contre l'hydrolyse des liaisons restées sous la forme amide.

TABLEAU I

APPLICATION COMPARÉE DE LA TECHNIQUE DE SANGER ET DE L'OXYDATION PERIODIQUE A DES HYDROLYSATS PROTÉIQUES PARTIELS

Les quantités de „sérine totale" et de „formol total" ont été déterminées après une ébullition de 20 h des protéines dans HCl 20 %

Protéines	Durée de l'hydrolyse en heures (HCl 10 N à 30°)	Sérine possédant un NH <sub>2</sub> libre (en % de la „sérine totale"	Formol dosé après oxy- dation periodique (en % du „formol total")
Albumine d'oeuf	1	25.0	9.7
„	2	—	18.5
„	3	—	34.3
Fibroïne de la soie	1	19.2	10.9
„	2	—	23.3
Insuline	1	21.2	10.4

La présence possible de cycles oxazoline et thiazoline a été quelquefois envisagée dans les protéines intactes. En ce qui concerne les cycles oxazoline, cette suggestion est intéressante car on ignore à l'heure actuelle l'état dans lequel se trouvent les groupes —OH protéiques. On sait évidemment qu'ils sont susceptibles d'entrer quelquefois en réaction avec des agents méthylants<sup>18, 19</sup> sulfatants<sup>20</sup> ou phosphorylants<sup>21, 22, 23</sup>, mais par suite de la faible réactivité chimique présentée par ces groupes, les conditions opératoires sont toujours brutales et peuvent provoquer la rupture préalable de liaisons labiles. Il faut remarquer toutefois que si les protéines natives contenaient de tels cycles, on pourrait s'attendre à les voir manifester, dans une certaine mesure tout au moins, les propriétés caractéristiques des oxazolines substituées. En particulier, un simple chauffage modéré dans un acide dilué devrait entraîner la rupture des cycles et l'hydrolyse spécifique des liaisons (I). Rappelons qu'aucun des résultats expérimentaux contenus dans le présent travail, ne permet de confirmer ce point.

Quant aux cycles thiazoline, on a tenté d'attribuer à leur présence l'état de „non-réactivité" de certains groupes —SH protéiques<sup>24</sup>. Dans ce domaine encore, des renseignements nouveaux pourront être acquis par la technique de SANGER dès que l'on connaîtra les propriétés des DNP dérivés de la cystéine.

Remarquons enfin pour terminer que si les protéines se comportaient comme les molécules simples étudiées par BERGMANN, un traitement au chlorure de thionyle suivi d'une hydrolyse très douce dans HCl dilué devrait permettre de scinder ces substances de façon tout à fait spécifique au niveau de leurs liaisons (I). Une expérience préliminaire effectuée sur l'albumine d'oeuf semble malheureusement montrer qu'il n'en est rien.

Une partie de ce travail a été effectuée à la School of Biochemistry de l'Université de Cambridge grâce à la large hospitalité offerte à l'un de nous par Prof. CHIBNALL. Il nous est agréable de l'en remercier ici très vivement et d'exprimer notre amicale gratitude à Dr SANGER et Mr PORTER pour les excellents conseils qu'ils nous ont prodigués.

## RÉSUMÉ

Au cours du présent travail nous avons appliqué à des hydrolysats chlorhydriques partiels de diverses protéines la technique d'oxydation périodique et la technique de SANGER au dinitrofluorobenzène. Ces deux techniques permettent d'obtenir des renseignements qualitatifs et quantitatifs sur les amino-acides situés à l'extrémité aminée des chaînes peptidiques. Mais tandis que la première est étroitement limitée au domaine des acides  $\beta$  hydroxylés, la seconde, plus générale, embrasse presque tous les acides.

Nous avons alors pu montrer que :

1. la stabilité à l'hydrolyse acide des liaisons peptidiques où un acide  $\beta$  hydroxylé se trouve impliqué par sa fonction amine (liaisons(I)), est bien inférieure à la stabilité moyenne des autres liaisons;

2. les différences observées sont d'autant plus importantes que l'acide est plus concentré et la température d'hydrolyse plus basse.

3. de tous les groupements libres protéiques, les groupements  $-OH$  sont les seuls, dans nos conditions expérimentales, à exercer un effet labilisateur notable sur les liaisons peptidiques situées à leur voisinage immédiat. L'influence des groupes  $-SH$  et la vitesse d'hydrolyse des liaisons de la proline n'ont pu toutefois être étudiées.

Nous présentons alors une hypothèse basée sur certains résultats expérimentaux, tendant à expliquer l'instabilité particulière des liaisons (I) par la formation à leur niveau d'un cycle oxazoline provoquant le transfert de la chaîne acylée de l'azote sur l'oxygène.

Certains points concernant, d'une part, la formation d'ammoniaque dans les hydrolysats protéiques et, d'autre part, l'existence de bouts de chaînes peptidiques dans l'albumine d'œuf et la fibroïne de la soie ont été enfin subsidiairement évoqués.

## SUMMARY

In the present work we have applied to hydrochloric partial hydrolysates of various proteins the periodic oxidation technique and SANGER's dinitrofluorobenzene technique. These two techniques give qualitative and quantitative information on the amino acids at the amino extremities of peptide chains; but while the first is strictly limited to the  $\beta$ -hydroxy-acids, the second, and more general, method applies to almost all acids.

We have thus been able to show that:

1. The stability to acid hydrolysis of peptide linkages where a  $\beta$ -hydroxy-acid is involved as an amine (linkages (I)) is much less than the average stability of other linkages.

2. The observed differences become more important as the concentration of the acid is raised and the temperature of hydrolysis is lowered.

3. Of all the free groups present in proteins, only the OH groups, in our experiments, are found to exercise any appreciable effect of labilisation on peptide linkages situated in their immediate neighbourhood. It has not, however, been possible to study the influence of SH groups and the speed of hydrolysis of the proline linkages.

We put forward a hypothesis, based on certain experimental results, with the view of explaining the particular instability of linkages (I) by the formation at their level of an oxazoline ring by the transfer of the acylated chain from the nitrogen to the oxygen.

Finally, certain points have also been considered that have to do with the formation of ammonia in protein hydrolysates on the one hand, and on the other, with the existence of chain-endings in egg albumin and silk fibroin.

## ZUSAMMENFASSUNG

Im Laufe der vorliegenden Arbeit haben wir auf partielle Salzsäurehydrolysate verschiedener Eiweisskörper die Methode der Perjodtoxydation und die Methode von SANGER mit Dinitrofluorbenzen angewandt. Diese beiden Methoden ermöglichen es, qualitative und quantitative Aufschlüsse über die am aminierten Ende der Peptidketten gelegenen Aminosäuren zu erhalten. Während aber die erste Methode eng auf das Gebiet von  $\beta$ -Hydroxysäuren beschränkt ist, umfasst die zweite, allgemeinere, beinahe alle Säuren.

Wir konnten zeigen, dass:

1. bei Säurehydrolyse die Stabilität der Peptidbindungen, an denen eine  $\beta$ -Hydroxysäure mit ihrer Aminfunktion beteiligt ist ((I) Bindungen), deutlich geringer ist als die durchschnittliche Stabilität anderer Bindungen;

2. die Beobachteten Unterschiede desto deutlicher sind, je konzentrierter die Säure und je niedriger die Hydrolysetemperatur ist;

3. unter unseren experimentellen Bedingungen, von allen freien Gruppen in Eiweisskörpern die

-OH-Gruppen die einzigen sind, die einen deutlichen Labilisator-effekt auf Peptidbindungen in ihrer unmittelbaren Nähe ausüben. Der Einfluss von -SH-Gruppen und die Hydrolysegeschwindigkeit von Prolinbindungen konnten noch nicht untersucht werden.

Wir stellen auch eine auf gewissen experimentellen Resultaten beruhende Hypothese auf, die die besondere Instabilität der (I)-Bindungen durch die Bildung eines Oxazolinringes, der die Übertragung der azylierten Kette vom Stickstoff auf den Sauerstoff hervorruft, erklären soll.

Einige Punkte, die einerseits die Bildung von Ammoniak in Eiweisshydrolysaten, und andererseits die Existenz von Enden von Peptidketten bei Ei-albumin und Seidefibrin betreffen, werden schliesslich auch erwähnt.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1369.
- <sup>2</sup> F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- <sup>3</sup> M. BERGMANN, E. BRAND ET F. DREYER, *Ber.*, 54 (1921) 936.
- <sup>4</sup> M. BERGMANN, E. BRAND ET F. WEINMANN, *Z. physiol. Chem.*, 131 (1923) 1.
- <sup>5</sup> M. BERGMANN ET A. MIEKELEY, *Z. physiol. Chem.*, 140 (1924) 128.
- <sup>6</sup> S. BLACKBURN, N. R. MIDDLEBROOK ET H. PHILLIPS, *Nature*, 150 (1942) 57.
- <sup>7</sup> B. H. NICOLET ET L. A. SHINN, *J. Am. Chem. Soc.*, 61 (1939) 1615.
- <sup>8</sup> P. DESNUELLE ET S. ANTONIN, *Helv. Chem. Acta*, 29 (1946) 1306.
- <sup>9</sup> H. FRAENKEL-CONRAT, *J. biol. Chem.*, 148 (1943) 453.
- <sup>10</sup> P. DESNUELLE ET S. ANTONIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 50.
- <sup>11</sup> E. J. CONWAY ET E. O'MALLEY, *Biochem. J.*, 36 (1942) 655.
- <sup>12</sup> P. DESNUELLE, S. ANTONIN ET M. NAUDET, *Bull. Soc. Chim. biol. (trav.)*, 26 (1944) 1168.
- <sup>13</sup> T. WINNICK, *J. biol. Chem.*, 142 (1942) 461.
- <sup>14</sup> M. W. REES, *Biochem. J.*, 40 (1946) 632.
- <sup>15</sup> A. C. CHIBNALL, *Proc. Roy. Soc.*, 131 (1942) 136.
- <sup>16</sup> W. T. ASTBURY, *Nature*, 137 (1936) 803.
- <sup>17</sup> A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1435.
- <sup>18</sup> S. BLACKBURN, E. G. H. CARTER ET H. PHILLIPS, *Biochem. J.*, 35 (1941) 627.
- <sup>19</sup> A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 37 (1943) 538.
- <sup>20</sup> H. C. RIETZ, R. E. FERREL, H. FRAENKEL-CONRAT ET H. S. OLCOTT, *Journ. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 1024 et 1031.
- <sup>21</sup> C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 21 (1927) 272.
- <sup>22</sup> M. HEIDELBERGER, B. DAVIS ET H. TREFFERS, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 498.
- <sup>23</sup> M. MAYER ET M. HEIDELBERGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 18.
- <sup>24</sup> K. LINDERSTRÖM-LANG ET C. F. JACOBSEN, *Compt. Rend. trav. Lab. Carlsberg*, 23 (1940) 289.

Reçu le 3 Octobre 1947