

QUELQUES NOUVELLES OBSERVATIONS
SUR LE MODE D'ATTAQUE DE LA GLOBINE DE CHEVAL
ET DE L'ALBUMINE D'ŒUF PAR LA PEPSINE

par

P. DESNUELLE, M. ROVERY ET G. BONJOUR

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

Pendant longtemps on a considéré la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine comme des "protéinases" en soulignant que ces enzymes attaquent les protéines et qu'elles se différencient des "peptidases" hydrolysant les peptides. Cette manière de voir a été critiquée récemment par BERGMANN qui, dans une série de travaux^{1, 2, 3, 4}, a montré que des liaisons appartenant à des peptides synthétiques très simples peuvent être scindées par les "protéinases" pourvu que ces liaisons relient certains amino-acides déterminés et qu'elles soient environnées de groupements ionisés convenables. L'auteur propose alors d'appeler ces enzymes des endopeptidases⁵.

Parmi les peptides synthétisés par BERGMANN, la carbo benzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine semble constituer un substrat de choix pour la pepsine. Ce peptide présente trois traits caractéristiques: il possède deux fonctions COOH, il est dépourvu de fonction NH₂ et il contient un amino-acide aromatique sur le côté amine de la liaison sensible. Or, dès que l'un de ces traits s'atténue ou disparaît, l'action enzymatique diminue ou même s'arrête complètement.

Ces observations sont évidemment intéressantes, mais elles ne semblent pas, comme l'avait cru BERGMANN, conduire à une théorie générale de l'action pepsique sur les peptides. HARRINGTON ET PITTRIVERS⁶ ont en effet montré que la tyrosylcystéine, bien que non-conforme aux critères de BERGMANN, est cependant hydrolysée par la pepsine. Des études ultérieures portant sur une série beaucoup plus vaste de peptides synthétiques devront donc être entreprises avant que des conclusions précises puissent être formulées dans ce domaine.

A plus forte raison, les travaux précédents ne laissent rien préjuger de l'action de la pepsine sur ses substrats naturels, les protéines. Tout au plus suggèrent-ils l'idée que cette action est peut-être spécifique, c'est-à-dire qu'elle est dirigée sur certains types de liaisons peptidiques de préférence aux autres.

Quand une liaison peptidique d'une protéine est rompue par hydrolyse, il apparaît dans le milieu une fonction α -NH₂ et une fonction α -COOH nouvelles. Si les amino-acides auxquels appartiennent ces fonctions pouvaient être déterminés, la nature de la liaison serait alors connue et, du même coup, l'influence qu'exerce cette nature sur la

stabilité de la liaison. Malheureusement, seuls les α -NH₂ peuvent, à l'heure actuelle, être caractérisés d'une manière simple*.

Quoiqu'il en soit, une première tentative en vue de déceler une spécificité éventuelle de l'action pepsique a été récemment effectuée par LAINE⁸. Observant que les hydrolysats pepsiques de zéine contiennent des quantités importantes d'ammoniaque et que l'on y trouve, après traitement à l'acide nitreux, de l'acide oxyglutarique, l'auteur en conclut que la pepsine attaque préférentiellement au sein de la zéine les liaisons dans lesquelles la glutamine se trouve impliquée par sa fonction amine**. Cette interprétation prête d'ailleurs à la critique, car les hydrolysats étudiés par LAINE sont vieux de 52 jours. En outre, des techniques beaucoup plus satisfaisantes sont maintenant à notre disposition pour caractériser les α -NH₂ des protéines: celle de l'oxydation périodique et, surtout, celle de SANGER au fluorodinitrobenzène⁹. Grâce à elles, nous avons récemment montré que l'acide chlorhydrique concentré et froid hydrolyse dans les protéines les liaisons "sérine" et "thréonine"*** notamment plus vite que les autres liaisons peptidiques.

Il nous a paru intéressant d'appliquer ces deux techniques aux hydrolysats enzymatiques bien qu'elles ne soient pas susceptibles à elles seules de résoudre complètement le problème de la spécificité de la pepsine et, plus généralement, des endopeptidases selon BERGMANN. Si cette spécificité porte, en effet, sur la nature de l'amino-acide carboxyle, nos techniques ne nous apprendront rien. Attaquer le problème dès maintenant n'est toutefois pas inutile même si sa solution définitive est encore hors de portée. Au cours de ce premier travail, nos essais ont été effectués sur les hydrolysats pepsiques de globine de cheval et d'albumine d'œuf.

Tel a donc été notre but initial. Mais, en outre, les résultats fournis par la technique de SANGER joints à ceux de la technique classique de VAN SLYKE nous ont permis de tirer quelques conclusions intéressantes concernant les peptides formés au cours de l'hydrolyse des deux protéines et les variations que fait subir l'enzyme à leur longueur moyenne.

Cette question a d'ailleurs fait l'objet déjà de quelques recherches en ce qui concerne plus particulièrement l'hydrolyse pepsique de l'albumine d'œuf. Chose curieuse, l'existence, dans ce cas, de peptides intermédiaires entre la protéine intacte et les petits peptides finaux semble très difficile à saisir¹¹. On a donc pensé que les molécules d'albumine subissent successivement, au contact de la pepsine, une sorte "d'explosion" donnant directement naissance aux produits ultimes de dégradation. Admise ultérieurement pour l'hydrolyse pepsique de la β -lactoglobuline¹², la validité de cette hypothèse a été récemment mise en doute, dans le cas de l'albumine, par MORING-CLEAESSON¹³. D'après les chiffres publiés par ce dernier auteur, la longueur moyenne des peptides varierait en cours d'hydrolyse de 6.5 à 3 environ****. De plus, l'existence de longs peptides pourrait être décelée, au début de l'hydrolyse tout au moins, grâce à la technique de l'analyse frontale.

Quant aux peptides auxquels la globine donne naissance sous l'influence de la pepsine, aucune étude n'en avait encore été entreprise*****.

* LENZ⁷ a bien proposé une méthode pour caractériser les α -COOH protéiques, mais elle semble d'une application délicate aux hydrolysats partiels.

** Pour simplifier l'exposé, une liaison peptidique dans laquelle un aminoacide X se trouve impliqué par sa fonction amine sera dorénavant appelée liaison "X".

*** Et non de 10 à 3, comme il est indiqué dans le travail original.

**** L'hydrolyse pepsique de l'insuline a été également étudiée récemment par BUTLER¹⁴ et celle de la caséine par WINNICK¹⁵. Nous en parlerons le moment venu.

TECHNIQUES DE PRÉPARATION ET DE DOSAGE

I. Diverses techniques de dosage

1. N-NH₂. Ce dosage, permettant, après certaines corrections, de calculer le nombre de liaisons rompues par l'enzyme, a été effectué par la technique habituelle de VAN SLYKE (Température: 25°, 1/4 h d'agitation, solution de nitrite de Na à 50%, chambre de réaction à l'obscurité). Ces conditions sont assez arbitraires et la valeur absolue de nos chiffres n'est certainement pas rigoureuse. Ces chiffres, tout au moins, sont comparables entre eux, car les mêmes conditions opératoires ont été maintenues d'un bout à l'autre du travail.

2. N-NH₂ et N-COOH. La teneur de nos hydrolysats enzymatiques en ces diverses formes d'azote (respectivement: azote ammoniacal et azote appartenant à des amino-acides libres) a été déterminée par microdiffusion dans l'acide borique selon CONWAY ET O'MALLEY¹⁶ et décarboxylation à la ninhydrine¹⁷.

3. N-sérine et N-thréonine. Le dosage de la thréonine et de la sérine situées aux extrémités aminées des chaînes peptidiques doit pouvoir s'effectuer, en principe, par les mêmes techniques d'oxydation périodique que pour les aminoacides libres correspondants^{18*}. Sous leur forme courante toutefois, ces méthodes ne nous ont pas semblé suffisamment sensibles. Notons, en effet, que les endopeptidases ne libèrent généralement sous forme aminée que 15-25% de l'azote des protéines. L'apparition, aux extrémités aminées des chaînes, de 3-5% de la sérine ou de la thréonine totale est donc déjà fort importante et doit pouvoir être décelée. C'est pour cette raison que nous avons modifié notablement les méthodes afin d'accroître leur sensibilité, quitte à sacrifier un peu de leur précision.

A. pour la sérine: 3 ml de l'hydrolysat enzymatique sont traités par le periodate de Na dans les conditions générales indiquées par REES¹⁸ (antimousse: alcool octyle). Le distillat est recueilli dans une solution refroidie de 420 mg de chlorhydrate de phénylhydrazine dans 20 ml d'eau. L'opération est interrompue quand le volume du distillat atteint 250 ml. Sur des prises d'essai de 12 ml, le dosage colorimétrique ordinaire du formol est alors effectué¹⁹. Cette technique permet de doser, avec une erreur par défaut n'excédant pas 10%, 200 γ de sérine en présence de 100 mg de protéine. Dans le cas général, il sera ainsi possible de déceler avec une précision raisonnable l'apparition aux extrémités aminées des chaînes peptidiques de 5% environ de la sérine totale.

B. pour la thréonine: 3 ml de l'hydrolysat sont soumis à l'oxydation périodique dans l'appareil décrit par ALEXANDER ET SELIGMAN²⁰ pour le microdosage de lalanine. Le milieu réactionnel est le même que précédemment (antimousse: alcool benzyle). Il est porté à l'ébullition et l'acétaldéhyde est entraîné pendant 90 minutes dans un barboteur à bisulfite plongé dans un bain de glace. L'oxydation une fois terminée, l'acétaldéhyde est dosé colorimétriquement au moyen du *p*-hydroxy-diphényle selon la technique préconisée par les auteurs précédents. Un essai à blanc souvent important est déduit des résultats du dosage.

La technique permet de doser 50 γ de thréonine en présence de 100 mg de protéine, avec une erreur de ± 15%.

II. Pepsine utilisée

Nous nous sommes servis, sans autre purification, d'une préparation enzymatique cristallisée provenant de la Maison ARMOUR (Chicago). Son activité, déterminée par la technique d'ANSON²¹, était de 56 unités par g. Notons d'ailleurs que les résultats fournis par cette technique varient considérablement selon l'âge de l'hémoglobine de bœuf servant de substrat à l'enzyme. C'est ainsi, par exemple, que notre pepsine manifestait une activité de 56, 36 ou 21 unités selon qu'elle agissait sur un substrat très frais ou datant de 15 et 30 jours respectivement.

* Il est malheureusement difficile de savoir si les mêmes conditions expérimentales sont valables pour les aminoacides et les peptides.

III. Préparation et caractéristiques des substrats

L'albumine d'oeuf a été cristallisée d'après KEKWICK ET CANNAN²². Nos préparations contenaient invariablement 4.3% de leur azote sous forme aminée (4.5% d'après CHIBNALL²³, 3.1-3.5% d'après MORING-CLAESSON¹⁸). Après dispersion dans le dodécylsulfate, la protéine renfermait 1.2% de -SH (calculé en cystéine). Cette dernière valeur est en parfait accord avec celle indiquée par GREENSTEIN²⁴. Enfin, la méthode de SANGER, comme l'ont déjà signalé DESNUELLE ET CASAL¹⁰, n'a pas permis de déceler le moindre α -NH₂ dans la protéine.

La préparation de la globine de cheval nécessite l'obtention préalable de l'hémoglobine cristallisée correspondante. Cette dernière (ADAIR ET ADAIR²⁵) est ensuite traitée par l'acétone chlorhydrique²⁶ à 0°. Après avoir été précipitée, la globine a été soigneusement lavée à l'acétone et à l'éther, puis elle a été séchée sous vide à l'exsiccateur. 7.3% de son azote se trouvaient alors sous forme aminée. Cette valeur, retrouvée constamment sur plusieurs échantillons, est nettement plus élevée que celle de 6.6% indiquée par CHIBNALL²³. Notons d'ailleurs que, si une molécule de globine de cheval (P.M. = 63 400 d'après ASTBURY²⁷) ne contient réellement que 40 fonctions ϵ -NH₂ et 5 ou 6 fonctions α -NH₂ (PORTER²⁸), sa teneur en azote aminé ne devrait pas excéder 6%. De même, celle de l'albumine d'oeuf (19 ϵ -NH₂ pour 45 000 g, pas de fonction α -NH₂) devrait être de 3.7% seulement.

Les extrémités aminées des chaînes de la globine de cheval sont bien toutes occupées par de la valine. Nous n'en trouvons cependant que 5 au lieu des 6 qu'indique PORTER²⁸.

Les Tableaux I et II réunissent, pour les deux protéines les diverses caractéristiques analytiques dont nous allons avoir besoin. Ces caractéristiques ont été sélectionnées dans toute la mesure du possible, afin d'offrir le maximum de garantie.

TABLEAU I
NOMBRE DE "RESTES" DES DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS DANS
L'ALBUMINE D'ŒUF ET LA GLOBINE DE CHEVAL

Amino-acides	Nombre de "restes" dans	
	1 mol. de globine (63 400 g)	1 mol. d'albumine (45 000 g)
Glycocolle	49	18
Alanine	44	34
Valine	48	18
Leucine	76	33
Isoleucine	0	24
Phenylalanine	28	20
Proline	12	14
Acide glutamique	40	49
Acide aspartique	53	27
Arginine	13	15
Histidine	34	7
Lysine	39	19
Tyrosine	12	10
Tryptophane	7	3
Sérine	36	35
Thrénine	24	16
Méthionine	4	16
$\frac{1}{2}$ Cystine	6	6
Total		
{ trouv ^e	525	364
corr ^é	560	400

TABLEAU II
AUTRES RENSEIGNEMENTS ANALYTIQUES CONCERNANT LA GLOBINE ET L'ALBUMINE

	Globine	Albumine
Nb. de chaînes peptidiques ouvertes	5-6	0
Pds moléculaire moyen du "reste"	112.8	112.5
N total (p. 100 g de protéine)	17.1	15.8
N-NH ₂ (en pour cent de N total)		
initial { calculé	6.0	3.7
trouvé (VAN SLYKE)	7.3	4.3
susceptible d'apparaître pendant l'hydrolyse totale	70.2	72.9

IV. Technique de SANGER au I. 2. 4-fluorodinitrobenzène.

Cette technique qui, rappelons-le, permet d'identifier et de doser les aminoacides situés aux extrémités aminées des chaînes peptidiques, est maintenant assez classique pour qu'il ne soit pas nécessaire d'y consacrer ici un long commentaire. Signalons donc simplement certains points particuliers:

1. Application à l'étude de l'hydrolyse protéique

Primitivement destinée à l'étude des protéines intactes, la technique peut également fournir des renseignements fort précieux sur leur hydrolyse¹⁰. Cette nouvelle application est d'ailleurs assez délicate, car, au cours de l'hydrolyse, des fonctions α -NH₂* nombreuses et variées sont susceptibles d'apparaître. De plus, il est souvent impossible de purifier les DNP-peptides comme les DNP-protéines⁹ et la séparation chromatographique ultérieure est alors compliquée par la présence de certains artefacts.

2. Obtention d'un silicagel convenable

CONSDEN a déjà indiqué²⁹ que tous les DNP-aminoacides, quelque soit la phase mobile en jeu, migrent à grande vitesse quand le silicagel est dépourvu de propriétés adsorbantes. Mais, quand il est trop adsorbant, tous les dérivés restent en haut des colonnes. L'obtention d'un gel convenable est donc assez délicate. Toutes les précautions indiquées par TRISTAM³⁰ doivent être évidemment prises, et il faut veiller, de plus, à ce que la dernière suspension du gel dans HCl dilué ait un pH bien déterminé. Plus ce pH est bas, plus le gel est rapide comme l'indiquent les chiffres du Tableau III.

TABLEAU III
RAPIDITÉ DU SILICAGEL EN FONCTION DU PH DE SA DERNIÈRE SUSPENSION

pH de la dernière suspension (pendant 12 h)	DNP-aminoacide	Valeur de "R" sur colonne de chloroforme
2.0	{ Leucine	0.8
	Tyrosine	0.3
4.0-5.0	{ Leucine	0.5
	Tyrosine	0.04

* Dans ce qui suit, nous appelons α -NH₂ les fonctions aminées situées aux extrémités des peptides, par opposition avec les fonctions ϵ -NH₂ des chaînes latérales de la lysine. Le nombre de fonctions α -NH₂ apparues pendant une hydrolyse est évidemment égal au nombre des liaisons rompues.

Ces chiffres ne sont d'ailleurs donnés qu'à titre indicatif. Leur valeur absolue, pour un même p_H , peut varier notablement d'une préparation à l'autre.

Les séparations chromatographiques sont rendues quelquefois plus aisées quand on dispose d'une gamme de silicagels différents. C'est ainsi, par exemple, que nous faisons passer, en un premier temps, les DNP-aminoacides éthérosolubles sur une colonne rapide 1% butanol-chloroforme qui permet d'obtenir, d'une part, 3 bandes distinctes (acide aspartique, acide glutamique + sérine, thréonine) et, d'autre part, une bande rapide ($R > 1$) contenant tous les autres DNP-dérivés et les artefacts. Cette dernière bande est reprise sur une colonne lente de chloroforme qui sépare les artefacts et les DNP-aminoacides en trois grands groupes.

3. Pour cent de récupération des divers DNP-aminoacides

Le processus de séparation selon SANGER ne va pas évidemment sans pertes notables. Se produisant pendant l'hydrolyse et aussi pendant les passages sur colonnes, les évaporations etc., elles sont susceptibles, comme le remarque très justement BUTLER³¹, d'entraîner des erreurs sensibles. Nous avons donc pris beaucoup de soin à les estimer d'une façon aussi précise que possible en traitant des mélanges de DNP-aminoacides purs dans les conditions des expériences réelles. Les pertes ainsi déterminées se sont souvent révélées supérieures à celles indiquées par PORTER ET SANGER²⁸. Chaque expérimentateur doit donc déterminer, en fonction des silicagels dont il dispose et en fonction aussi de sa technique particulière, ses propres coefficients de correction. Nous nous contentons d'évoquer ici un cas particulièrement net: le DNP-tryptophane n'est pas stable à l'hydrolyse acide. Après 18 heures d'ébullition dans HCl 5.5 N, une faible part du dérivé (30% environ) est récupérée. Le reste se retrouve, sous forme d'un artefact, dans la phase aqueuse.

4. Dosage colorimétrique des DNP-aminoacides

SANGER conseille d'effectuer les dosages colorimétriques des DNP-aminoacides éthérosolubles sur des solutions bicarbonatées. Ces solutions sont quelquefois troubles et nous préférions opérer systématiquement dans HCl N bien que l'intensité de la coloration soit plus faible et que certains DNP-dérivés soient peu solubles en milieu acide.

5. DNP-aminoacides hydrosolubles

La séparation chromatographique des DNP-aminoacides solubles dans l'eau a reçu jusqu'ici beaucoup moins d'attention que celle des dérivés éthérosolubles. En particulier la caractérisation de faibles quantités d' α -DNP-arginine, en présence de quantités toujours importantes de ϵ -mono-DNP-lysine, semble difficile. De plus, la di-DNP-histidine est toujours accompagnée de plusieurs artefacts migrant à des vitesses peu différentes de la sienne.

V. Mise en oeuvre des hydrolyses enzymatiques

Les conditions expérimentales différant légèrement selon les essais, nous ne pouvons en donner ici un aperçu général. Indiquons simplement que la protéine-substrat est toujours préalablement dénaturée par un séjour de 5 min. au B.M. bouillant à p_H acide (4.0 ou 2.0). Ce traitement n'entraîne évidemment par lui-même aucune hydrolyse sensible. La température du milieu réactionnel est maintenue à 35°5 et son p_H initial est 2.0.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'ALBUMINE D'OEUF ET DE LA GLOBINE DE CHEVAL

Avant d'entrer dans le détail de l'action enzymatique, il semble bon d'en fixer tout d'abord les grandes lignes en étudiant, dans diverses conditions, la mise en liberté de l'azote aminé (rupture des liaisons peptidiques), de l'azote ammoniacal (désamination des "restes" de la glutamine et de l'asparagine) et, enfin, de l'azote carboxyle (libération d'amino-acides). Les protéines (albumine ou globine), mises en solution à 3%, sont préalablement dénaturées. Après refroidissement, une quantité convenable de pepsine est ajoutée et le mélange est porté dans un thermostat à 35°. Des échantillons sont prélevés successivement sur lesquels on applique les diverses techniques analytiques décrites précédemment. Les résultats sont donnés dans les Tableaux IV et V.

Dans le Tableau IV nous avons tenu compte de l'hydrolyse des liaisons de la proline (dont la stabilité est supposée égale à la stabilité moyenne des liaisons peptidiques dans les conditions de l'hydrolyse) et de la présence d'ammoniaque (l'ion ammonium donnant 55% de son azote pendant le dosage VAN SLYKE). Notons d'ailleurs que les deux facteurs correctifs se trouvant de signe contraire et, à peu de choses près, égaux, la correction globale est infime; nous l'avons donc négligée par la suite.

Le nombre des liaisons peptidiques rompues par molécule protéique se calcule en multipliant le pour cent de N-NH₂ apparu par 7.74 dans le cas de la globine et 5.06 dans le cas de l'albumine*. Le pour cent de rupture est alors aisément trouvé. Ce pour cent

TABLEAU IV

CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE L'ALBUMINE D'ŒUF ET DE LA GLOBINE DE CHEVAL
PROPORTIONS PONDÉRALES ENZYME/SUBSTRAT: 1/30 (1.87 UNITÉS PEPSINE PAR g DE PROTÉINE)

Protéine	Durée de l'hydrolyse (h)	N-NH ₂ VAN SLYKE apparu (en % de N total)	Corrections dues au		N-NH ₂ apparu corrigé (en % de N total)	N-COOH (en % de N total)	Liaisons rompues	
			N-proline (en % de N total)	N-NH ₂ (en % de N total)			Nb. moyen par mol.	%
Globine de Cheval	0	0.00	—	—	0.00	—	0	0
	1/2	5.85	0.09	0.08	5.86	0.41	45.3	8.1
	1 1/2	7.35	0.12	0.10	7.37	—	57.1	10.1
	3	8.93	0.14	0.12	8.95	1.07	69.3	12.3
	8	11.8	0.19	0.14	11.85	—	91.8	16.4
	14	13.3	0.21	0.16	13.35	—	103.2	18.4
	24	15.2	0.24	0.17	15.27	1.65	118.1	21.1
Albumine d'œuf	1/2	5.88	0.16	0.10	5.94	0.98	30.3	7.6
	1 1/2	7.15	0.20	0.14	7.21	—	36.8	9.2
	3	8.25	0.23	0.17	8.31	2.0	42.4	10.6
	8	10.35	0.29	0.22	10.42	—	53.0	13.2
	13	11.45	0.32	0.27	11.50	—	58.5	14.6
	24	12.25	0.34	0.30	12.29	2.8	62.5	15.6

* Le détail du calcul est le suivant, si X est le % de N-NH₂ apparu par rapport à N total:

$$\text{pour la globine: } \frac{X}{14} \cdot \frac{63400 \cdot 17.1}{100 \cdot 100}$$

$$\text{pour l'albumine: } \frac{X}{14} \cdot \frac{45000 \cdot 15.8}{100 \cdot 100}$$

TABLEAU V
CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE LA GLOBINE DE CHEVAL (SUITE)

Proportions pondérales enzyme/substrat	Durée de l'hydrolyse (h)	N-NH ₂ apparu (en % de N total)	Liaisons rompues	
			Nb. moyen par mol.	%
$\frac{1}{150}$ (0.37 unité pepsine par g de protéine)	$\frac{1}{8}$	4.0	30.9	5.5
	$\frac{1}{2}$	4.8	37.0	6.6
	$1\frac{1}{2}$	5.6	43.5	7.8
	$4\frac{1}{2}$	6.9	53.7	9.6
	8	9.0	69.5	12.4
	24	13.9	107	19.1
$\frac{1}{3000}$ (0.0187 unité pepsine par g de protéine)	$\frac{1}{8}$	1.3	10.1	1.8
	$\frac{1}{2}$	2.8	21.6	3.9
	$1\frac{1}{2}$	4.4	34.2	6.1
	4	5.0	39.0	7.0
	8	6.7	52.0	9.3
	24	6.7	52.0	9.3

peut aussi être calculé directement si l'on se souvient que l'hydrolyse de toutes les liaisons de la globine et de l'albumine provoque la libération sous forme aminée de, respectivement, 70.2 et 72.9% de l'azote protéique total (Voir Tableau II). Ces deux modes de calcul, bien qu'ils fassent appel à des valeurs analytiques différentes et indépendantes, conduisent à des résultats tout-à-fait analogues.

Les chiffres des Tableaux IV et V appellent les quelques remarques suivantes:

1. Comme il est connu d'ailleurs depuis longtemps, l'hydrolyse des deux protéines démarre tout d'abord rapidement. Puis, quand un certain nombre de liaisons sont rompues, la vitesse de cette hydrolyse diminue progressivement sans jamais d'ailleurs s'annuler tout-à-fait.

2. Quand le rapport enzyme/substrat est de $1/30$ (1.87 unités pepsine par g de protéine), l'hydrolyse de la globine semble progresser un peu plus vite que celle de l'albumine. Cette différence est mise clairement en évidence par les courbes de la Fig. 1 relatives au début de la dégradation des deux protéines par une quantité d'enzyme égale au $1/3000$ de leur poids seulement (0.0187 unité pepsine par g de protéine).

3. Nous confirmons enfin, une fois encore, que la pepsine libère, dès le début de son activité, des quantités sans doute faibles, mais non-négligeables d'aminoacides.

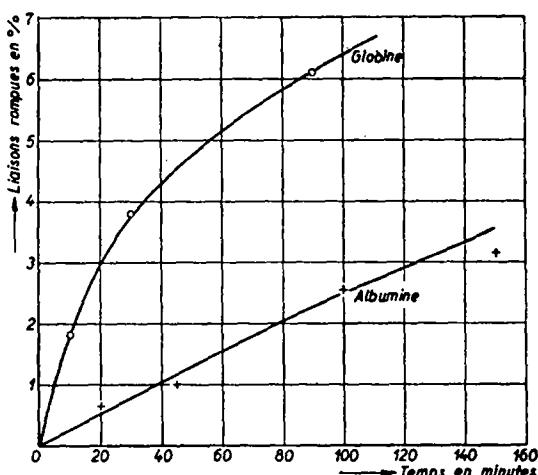


Fig. 1. Premiers stades de l'hydrolyse pepsique de l'albumine et de la globine (Rapport enzyme/substrat: $1/3000$; 0.0187 unités pepsine par g de protéine)

II. NATURE DES α -NH₂ LIBÉRÉS PAR L'HYDROLYSE PEPSIQUE

A. Oxydation périodique des hydrolysats

Les conditions générales d'expérience sont les mêmes que précédemment. Chaque hydrolysat est soumis à la technique de VAN SLYKE et à l'oxydation périodique (dosage du formol et de l'acétaldéhyde). Ces diverses déterminations permettent de savoir, respectivement, combien de α -NH₂ totaux et de α -NH₂ appartenant à la sérine et à la thréonine ont été libérés par la pepsine*. Les chiffres obtenus sont alors convertis en pour cent grâce aux valeurs analytiques du Tableau I. Les courbes des Figures 2 et 3 indiquent les variations subies par ces pour cent au cours de l'hydrolyse pepsique de l'albumine et de la globine.

L'examen des courbes des Fig. 2 et 3 montre que:

1. La labilité tout-à-fait particulière des liaisons "sérine" et "thréonine" dans HCl concentré¹⁰ ne se retrouve pas au cours de l'hydrolyse pepsique. Les points d'attaque

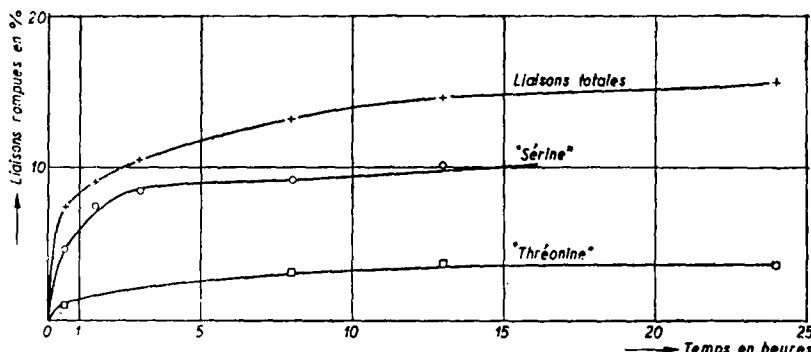


Fig. 2. Cinétique comparée de rupture des liaisons totales, "sérine" et "thréonine", au cours de l'hydrolyse pepsique de l'albumine d'oeuf. (Proportions enzyme/substrat: 1/30; 1.87 unités pepsine par g de substrat)

préférentiels de l'enzyme, s'ils existent, sont donc différents de ceux de l'acide et les peptides prenant naissance à partir d'une protéine déterminée ne sont pas les mêmes dans l'un et l'autre cas.

Ce fait ne doit d'ailleurs pas surprendre si l'on songe que les fonctions OH alcooliques labilisent les liaisons adjacentes vis-à-vis des acides parce qu'elles permettent une transposition¹⁰ à leur niveau. L'enzyme n'est évidemment pas capable de réaliser ce phénomène qui, d'ailleurs, n'accélérerait sans doute pas son action.

2. Toutefois, les liaisons "sérine" et "thréonine" ne se comportent pas toujours comme les autres liaisons.

Dans le cas de la globine, en effet, on constate que la vitesse de rupture des liaisons "sérine" est à peu près le double de la vitesse moyenne. De plus, 35% des liaisons "sérine" se trouvent scindés en fin d'hydrolyse alors que l'enzyme n'a coupé en moyenne que 21% des liaisons peptidiques de la protéine. Dans le cas de l'albumine, par contre, l'hydrolyse des liaisons "sérine" progresse à la vitesse moyenne tandis que celle des liaisons "thréonine" est particulièrement lente.

La technique de l'oxydation périodique ne permet évidemment d'atteindre que les

* Il revient évidemment au même de dire qu'un α -NH₂ sérine est apparu ou qu'une liaison "sérine" a été rompue. Nous utiliserons indifféremment par la suite ces deux modes d'expression.

$\alpha\text{-NH}_2$ portés par les acides hydroxyaminés. Son application aux hydrolysats pepsiques est cependant intéressante car elle nous indique pour la première fois que l'hydrolyse endopeptidase des liaisons d'une protéine n'obéit pas uniquement aux lois du hasard. La pepsine semble donc manifester une certaine spécificité dans son action hydrolysante et nous avons cherché à préciser la nature et l'étendue de cette spécificité par une technique plus générale.

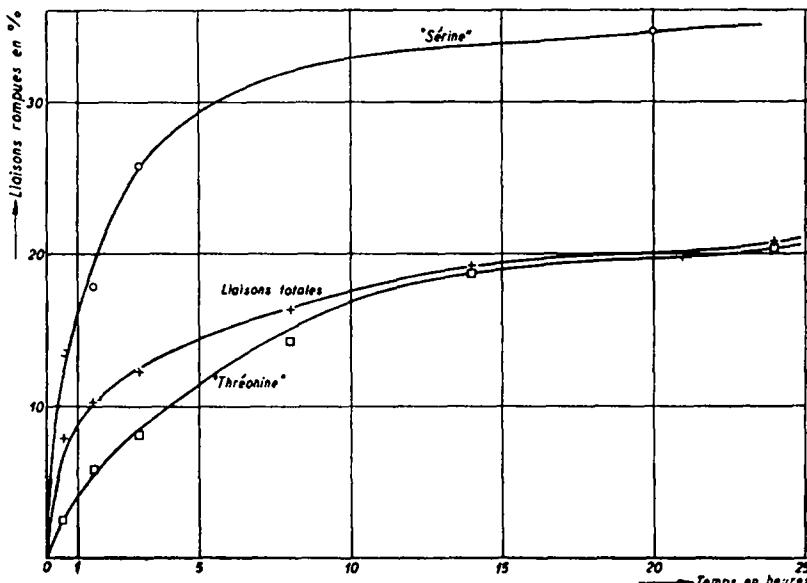


Fig. 3. Cinétique comparée de rupture des liaisons totales, "sérine" et "thréonine" au cours de l'hydrolyse pepsique de la globine de cheval (Proportions pondérales enzyme/substrat: 1/30; 1.87 unités pepsine par g de substrat).

B. Application de la technique de SANGER aux hydrolysats pepsiques

Notre but initial dans ce domaine a été de déterminer la nature des premiers $\alpha\text{-NH}_2$ libérés par la pepsine. C'est, en effet, tout au début de l'hydrolyse que la spécificité de rupture, si elle existe, doit se manifester le plus nettement. En fait, nous avons constaté une telle spécificité pour la globine, mais non pour l'albumine. La globine seule a donc fait l'objet d'une étude vraiment systématique qui nous a conduits, d'une part, à dresser un bilan complet des $\alpha\text{-NH}_2$ libérés au début de l'hydrolyse de cette protéine et, d'autre part, à rechercher comment se modifie ce bilan au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse.

Un volume convenable de l'hydrolysat enzymatique est traité pendant deux heures, après addition de bicarbonate et d'alcool, par le fluorodinitrobenzène (FDNB). Le mélange réactionnel est débarrassé de son alcool, puis il est acidifié et évaporé. Le résidu est ensuite hydrolysé 18 h dans HCl 5.5 N bouillant et les DNP-aminoacides sont séparés en fractions éthéro- et hydro-solubles. Chaque fraction est enfin analysée sur des colonnes convenables.

1. Cas de l'albumine. L'albumine en solution à 3% a été soumise à l'action de la pepsine (1/3000° de son poids; 0.0187 unités pepsine par g de substrat) pendant 2 h 20 min. On constate alors la libération de 2.2% de N-NH_2 (en pour cent de N total). Si toutes les molécules protéiques étaient dégradées simultanément de façon identique,

l'enzyme aurait ainsi rompu 11 liaisons peptidiques par molécule, soit 3 liaisons sur 100. Ces chiffres d'ailleurs sont dépourvus de toute signification réelle car les molécules d'albumine sont encore en grande partie intactes à ce stade de l'hydrolyse¹¹. Dans les quelques molécules attaquées, beaucoup plus de 3 liaisons sur 100 se trouvent donc rompues.

Analysée sur des colonnes de chloroforme et 1% butanol-chloroforme, la fraction éthérosoluble des DNP-aminoacides se révèle très complexe. Tous les dérivés possibles semblent y être représentés. L'étude détaillée des chromatogrammes serait donc très difficile. Nous y avons renoncé d'autant plus facilement qu'elle présente alors peu d'intérêt.

2. Cas de la globine de cheval. Dès le début de nos expériences avec la globine, nous avons constaté une spécificité beaucoup plus marquée. Il nous a paru alors intéressant d'étudier le problème de plus près en faisant varier la durée de l'hydrolyse et le rapport enzyme/substrat. L'hydrolyse a été stoppée selon les cas, soit au cours de sa première phase (transformation rapide de l'azote protéique en azote non-protéique), soit au cours de sa deuxième phase (lente dégradation ultérieure des peptides)*. Chaque fois, les produits de l'hydrolyse ont été traités par FDNB et les DNP-aminoacides formés ont été séparés et caractérisés sur des colonnes convenables, puis ils ont été dosés par colorimétrie (Tableau VI).

En ce qui concerne tout d'abord le premier essai réalisé en $\frac{1}{2}$ h avec un rapport enzyme/substrat de 1/3000 (0.0187 unités pepsine par g de substrat), l'analyse chromatographique ne permet pas de déceler avec certitude plus de 6 DNP-dérivés: DNP-valine, DNP-leucine, DNP-phénylalanine, DNP-alanine, DNP-sérine, DNP-thréonine. Sur le plan qualitatif donc, la spécificité apparaît tout-à-fait clairement. Abordons maintenant le problème sur le plan quantitatif et notons en premier lieu que 63 400 g de l'hydrolysat contiennent 5 α -NH₂ valine seulement. Aucune rupture ne s'est donc produite à côté de la valine puisque 1 mol de protéine intacte contient déjà 5 "restes" de cet aminoacide en bout de chaîne. D'autre part, parmi les α -NH₂ que l'hydrolyse fait apparaître, ceux appartenant à l alanine et à la phénylalanine prennent dès maintenant une importance particulière. Les chiffres du Tableau VI montrent, en effet, que l'hydrolyse des liaisons "alanine" et "phénylalanine" progresse à une vitesse plus de trois fois supérieure à la vitesse moyenne. En outre, nous confirmons le fait déjà trouvé par oxydation périodique: la pepsine attaque plus vite les liaisons "sérine" que la moyenne des liaisons.

Quand l'hydrolyse est un peu plus poussée (rapport enzyme/substrat: 1/3000 (0.0187 unités pepsine par g de protéine); durée: 1 h $\frac{1}{2}$), on constate que les liaisons de la valine ne sont toujours pas touchées (5.1 α -NH₂-valine), que l'hydrolyse des liaisons "leucine", relativement rapide au début, semble maintenant arrêtée et que celle des liaisons "alanine" et "phénylalanine" conserve et peut-être accentue son avance (1 liaison "alanine" sur 4 se trouve rompue à ce moment, tandis que 1 liaison moyenne sur 20 seulement est scindée). De plus, à côté des liaisons dont la rupture préférentielle s'était déjà manifestée dans l'expérience précédente, les liaisons "lysine" commencent également à subir une hydrolyse sensible.

Ces deux premiers essais, nous l'avons vu, permettent d'étudier l'hydrolyse pendant sa première phase. Le troisième (durée: $\frac{1}{2}$ h, rapport enzyme/substrat: 1/50 (1.87 unités pepsine par g de protéine)), se situe au début de la deuxième phase. Signalons alors que 63 400 g du mélange peptidique contiennent toujours 5 α -NH₂ valine seulement. Les

* L'existence de ces deux phases sera précisée par la suite.

TABLEAU VI

AMINOACIDES SITUÉS AUX EXTRÉMITÉS AMINÉES DES CHAINES PEPTIDIQUES PENDANT L'HYDROLYSE
PEPSIQUE DE LA GLOBINE DE CHEVAL
LA PROTÉINE CONTIENT 5 CHAINES "VALINE" PAR MOLÉCULE

	Valeur moyenne pour 1 mol. de protéine (63 400 g)	Pour cent liaisons totales	Pour cent liaisons rompues	Pour cent "restes" de l'aminoacide
<i>1. { Rapport pondéral enzyme/substrat: 1/3000 (0.0187 unités pepsine par g de protéine) Durée de l'hydrolyse: 1/2 h}</i>				
Nb. de liaisons peptidiques rompues	16.6 14.0 18.0	2.9 2.5 3.2	100 100 100	—
Nb. de "restes" d'amino-acides en bout de chaînes				
Valine	5.0 5.1 —	—	—	—
Leucine	3.4 3.7 —	—	21 26	4.5 4.9 —
Phénylalanine	2.5 3.2 —	—	15 22	9.4 11.4 —
Alanine	4.1 4.6 —	—	25 32	— 10.4 —
Sérine	2.8 — 3.0	—	17 — 18	7.8 — 8.3
Thrénanine	0.8 — 0.6	—	5 — 3	3.4 — 2.7
<i>2. { Rapport pondéral enzyme/substrat: 1/3000 (0.0187 unités pepsine par g de protéine) Durée de l'hydrolyse: 1 h 1/2</i>				
Nb. de liaisons peptidiques rompues	31.5	5.6	100	—
Nb. de "restes" d'amino-acides en bout de chaînes				
Valine	5.1	—	—	—
Leucine	3.4	—	10	3.5
Phénylalanine	5.9	—	19	21.0
Alanine	10.2	—	33	23.1
Lysine	2.3	—	7	5.9
Sérine	4.7	—	15	13.0
Thrénanine	—	—	—	—
<i>3. { Rapport pondéral enzyme/substrat: 1/30 (1.87 unités pepsine par g de protéine) Durée de l'hydrolyse: 1/2 h.</i>				
Nb. de liaisons peptidiques rompues	55	9.8	100	—
Nb. de "restes" d'amino-acides en bout de chaînes				
Valine	5.2	—	—	—
Leucine	3.0	—	5.5	4.0
Phénylalanine	7.6	—	13.8	27.4
Alanine	14.0	—	25.5	31.8
Lysine	6.5	—	11.0	16.6
Sérine	7.5	—	13.6	20.7
Thrénanine	—	—	—	—
Autres aminoacides	5.0	—	9.1	1.6

liaisons "phénylalanine" et "alanine" sont maintenant profondément dégradées (1 liaison sur 3 environ). L'hydrolyse des liaisons "leucine" est toujours stationnaire tandis que celle des liaisons "sérine" suit son cours habituel. Mais, en plus, différents autres α -NH₂ commencent à apparaître, quoique chacun en faibles quantités. La spécificité tend donc, comme il est normal de le prévoir, à s'atténuer au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse.

En résumé, la pepsine paraît tout d'abord attaquer la molécule de globine préférentiellement aux liaisons "phénylalanine" et "alanine", ainsi que, dans une moindre mesure, aux liaisons "leucine" et "sérine". La rupture de ces liaisons provoque la transformation de la protéine en peptides "non protéiques" (Voir plus loin). Puis, quand ces derniers peptides sont, à leur tour, dégradés, d'autres liaisons sont alors touchées.

Pourquoi la pepsine manifeste-t-elle une certaine spécificité vis-à-vis des liaisons de la globine et aucune spécificité notable vis-à-vis des liaisons de l'albumine? Cette question ne peut pas, à l'heure actuelle, recevoir une réponse satisfaisante. Nous y reviendrons d'ailleurs quand la longueur des peptides libérés dans les deux cas nous sera un peu mieux connue.

Remarquons enfin pour terminer que les résultats obtenus avec la globine *et* l'albumine diffèrent profondément de ceux trouvés par LAINE avec la zéine⁸. Nous comptons entreprendre bientôt quelques expériences afin de rechercher l'origine de ce désaccord.

III. ETUDE PARTICULIÈRE DES FRACTIONS "PROTÉIQUE" ET "NON-PROTÉIQUE" DES HYDROLYSATS PEPSIQUES

Les hydrolysats étudiés jusqu'ici contiennent probablement à la fois des molécules protéiques intactes ainsi que des gros et des petits peptides. Ils sont donc fort hétérogènes et nous avons cherché à les fractionner, même grossièrement, en les traitant par l'acide trichloracétique. Nous avons ainsi obtenu une fraction "protéique" insoluble et une fraction "non-protéique" soluble.

L'effet du traitement à l'acide trichloracétique est d'ailleurs assez mal défini. D'une part, il est certain que l'acide précipite, non pas seulement des molécules protéiques intactes, mais aussi des peptides. On pense généralement que ces derniers sont plus longs que les peptides solubles constituant la fraction "non-protéique". Les mesures de poids moléculaires effectuées récemment par BUTLER^{9a} semblent bien confirmer cette manière de voir. A longueur égale toutefois, certains peptides ont probablement, de par leur constitution chimique, une tendance plus grande à la précipitation que d'autres. D'autre part, la position de la frontière séparant les fractions précipitables et non-précipitables varie selon les conditions expérimentales adoptées. En opérant cependant toujours dans des conditions rigoureusement identiques, on peut espérer obtenir des résultats à peu près comparatifs et, jusqu'à plus ample informé, nous considérons que la technique fournit un moyen simple de séparer les petits peptides d'un côté et, de l'autre, un mélange de protéine intacte et de gros peptides.

Deux questions méritent alors d'être posées: d'une part, comment se répartissent les α -NH₂ précédemment caractérisés, entre les gros et les petits peptides? D'autre part, comment varient le nombre et la longueur moyenne des gros et petits peptides au cours de l'hydrolyse pepsique?

On peut répondre à la première de ces questions en appliquant comparativement la technique de SANGER aux hydrolysats entiers et à leur fractions "protéiques". Les α -NH₂ qu'ils contiennent étant ainsi déterminés quant à leur nature et leur nombre, une simple différence fournit les mêmes renseignements pour la fraction "non-protéique". La deuxième question a déjà été abordée par différents auteurs^{13, 14} avec la seule aide

de la technique VAN SLYKE. La technique de SANGER, toutefois, est, dans ce domaine aussi, d'un précieux secours car elle permet une étude plus commode et surtout plus précise des milieux d'hydrolyse pauvres en α -NH₂. C'est donc en appliquant la technique de SANGER aux fractions "protéiques" et celle de VAN SLYKE aux hydrolysats entiers que nous avons pu suivre de façon assez approfondie le destin des peptides pendant l'hydrolyse pepsique des deux protéines.

Les précipitations sont effectuées selon BUTLER³² de la manière suivante: on traite les hydrolysats par 5 fois leur volume d'acide trichloracétique 0.3 M. Après homogénéisation, le mélange est laissé $\frac{1}{2}$ heure à la température ordinaire. Quand il s'agit uniquement de doser l'azote resté soluble, ou azote "non-protéique" (NNP), le mélange est simplement filtré autant de fois qu'il est nécessaire pour obtenir une liqueur claire et la teneur en azote total de cette liqueur est déterminée par micro-KJELDAHL. Quand il

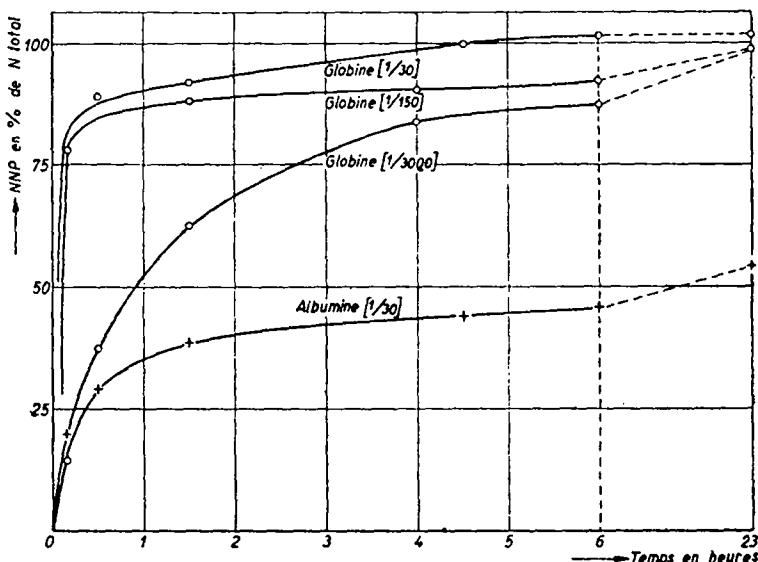


Fig. 4. Formation de l'azote "non-protéique" pendant l'hydrolyse de l'albumine et de la globine par la pepsine

s'agit par contre d'appliquer la technique de SANGER à la fraction "protéique", le mélange est centrifugé et le culot insoluble, après avoir été soigneusement lavé à l'acide trichloracétique 0.3 M, est mis en suspension dans une solution concentrée de HCO₃Na.

Avant d'étudier en détail les deux fractions, il est bon de connaître la cinétique de formation de l'azote "non-protéique" pendant l'hydrolyse pepsique de l'albumine et de la globine (fig. 4).

Les courbes de la Fig. 4 permettent de constater, que ce soit avec la globine ou l'albumine, une formation initiale massive d'azote "non-protéique". Ce fait suggère dans les deux cas que, au début de l'hydrolyse tout au moins, l'enzyme détache directement des peptides relativement courts sans s'attarder beaucoup à des ruptures internes. Mais une différence fondamentale entre les deux protéines se manifeste rapidement: avec la globine, la formation d'azote "non-protéique" est bientôt totale, même quand des quantités très faibles d'enzyme sont en jeu. Au cours d'une première phase donc, la protéine est complètement transformée en peptides solubles dans l'acide trichloracétique;

elle se comporte ainsi comme l'insuline¹⁴ et la caséine¹⁵. Puis, une seconde phase succède à la première, au cours de laquelle (Voir Tableau V) l'enzyme continue, quoique beaucoup plus lentement, à rompre des liaisons. Les peptides "non-protéiques" doivent alors subir une dégradation ultérieure qui diminue leur longueur moyenne.

Dans le cas de l'albumine, au contraire, la formation d'azote "non-protéique" ralentit considérablement quand elle atteint environ 50%**. Nous retrouvons donc là, au moyen d'une autre technique, des résultats analogues à ceux déjà signalés par TISELIUS¹¹ et MORING-CLAESSON¹³. Notons de plus que, pendant toute l'hydrolyse, l'azote aminé et l'azote "non-protéique" augmentent toujours simultanément et parallèlement. Cherchons maintenant à préciser ces notions.

A. Cas de la globine

a. Première phase de l'hydrolyse - Transformation rapide de la protéine en peptides "non-protéiques"

La globine est hydrolysée, dans les conditions habituelles, par la pepsine (1/3000° de son poids; 0.0187 unités pepsine par g de protéine) pendant $\frac{1}{2}$ h et 1 h $\frac{1}{2}$. Les fractions "protéiques", une fois séparées, sont mises en suspension dans HCO_3Na , puis elles sont traitées comme d'ordinaire par FDNB. Nous avons vérifié que la présence d'acide trichloracétique ne fait pas obstacle à la condensation du réactif avec les fonctions amine et qu'elle ne donne naissance à aucun artefact gênant..

TABLEAU VII

NATURE ET PROPORTIONS DES $\alpha\text{-NH}_2$ DANS LES FRACTIONS "PROTÉIQUES" ET "NON-PROTÉIQUES" DES HYDROLYSATS PEPSIQUES DE GLOBINE

Durée de l'hydrolyse (min)	Nature des $\alpha\text{-NH}_2$	Nombre des $\alpha\text{-NH}_2$			
		Dans 63 400 g		Dans (P)* g	
		de l'hydrolysat entier	de la fraction "protéique"	de la fraction "non-protéique"	de la fraction "protéique"
30	Valine	5.1	2.1	17.3	1.7
	Leucine	3.7	3.0	6.6	2.4
	Phényl-alanine	3.2	1.6	9.7	1.3
	Alanine	4.6	4.3	5.0	3.5
	Sérine	2.3	1.2	6.7	1.0
	$\alpha\text{-NH}_2$	18.9	12.2	45.9	9.9
	<i>total</i>				9.0
90	Valine	5.1	1.0	9.3	0.5
	Leucine	3.4	2.6	4.1	1.3
	Phényl-alanine	5.9	4.0	6.9	2.5
	Alanine	10.2	7.5	13.0	3.8
	Sérine	4.7	3.2	6.2	1.6
	$\alpha\text{-NH}_2$				
	<i>trouvés</i>	29.3	19.2	39.5	9.7
	<i>corrigés</i>	37.0	25.0	50.0	12.4
					19.6
					24.6

* En 30 minutes, 63 400 g de globine donnent 51 000 g de fraction "protéique" et 12 400 g de fraction "non-protéique". En 90 minutes, respectivement, 32 370 g et 31 030 g.

** Dans certaines de nos expériences d'ailleurs une quantité notablement plus grande de l'azote protéique devient soluble dans l'acide trichloracétique.

Dans le Tableau VII, on trouvera la nature et le nombre des divers α -NH₂ contenus dans les fractions "protéiques" et "non-protéiques" des hydrolysats. Le nombre des α -NH₂ a été rapporté, pour chaque fraction, soit à 63 400 g (afin de permettre une comparaison avec l'hydrolysat entier), soit au poids (P) de la fraction auquel 63 400 g de protéine ont donné naissance dans les conditions de l'essai.

Les chiffres du Tableau VII appellent les quelques commentaires suivants:

Après 30 minutes d'hydrolyse:

1. La technique au FDNB permet de déceler la présence, dans 63 400 g d'hydrolysat, de 19 α -NH₂. Ce chiffre est en bon accord avec celui fourni par le dosage VAN SLYKE (14 α -NH₂ apparus + 5 α -NH₂ valine). Les opérations chromatographiques ont donc été quantitatives et il n'est pas besoin d'apporter une correction quelconque à leurs résultats.

2. La fraction "protéique" n'est évidemment pas constituée uniquement de globine intacte car elle est moins riche que cette dernière en α -NH₂ valine (2.1 au lieu de 5.0) et elle renferme une quantité notable d'autres α -NH₂. Deux possibilités, entre lesquelles nos expériences ne permettent pas de choisir, peuvent alors être envisagées: ou bien cette fraction ne contient déjà plus de chaîne intacte; chaque chaîne initiale aurait alors donné naissance, en moyenne, à $9.9/5 = 2$ très gros peptides (Pds mol. moyen: 5100, longueur moyenne: 45). Ou bien on trouve dans la fraction un mélange de chaînes intactes et de gros peptides. Dans ce dernier cas, les α -NH₂ valine de la fraction "protéique" nous permettent d'affirmer que cette fraction renferme au maximum 21 500 g de chaînes intactes (34% du poids initial). Le poids des peptides serait alors 51 000 — 21 500 soit 29 500 g. Leur nombre serait $9.9 - 1.7 = 8.2$, leur pds mol. moyen 3600 et leur longueur moyenne 32. Chaque chaîne initiale aurait alors donné $\frac{9.9 - 1.7}{5.0 - 1.7} = 2.5$ peptides

"protéiques" dépourvus de α -NH₂ valine.

3. La fraction "non-protéique", de son côté, pèse 12 400 g et contient 9 peptides. Ces derniers ont donc un poids moléculaire moyen de 1380 et une longueur moyenne égale à 12 environ. Si toutes les chaînes protéiques ont été attaquées, chacune a livré environ 2 de ces peptides. Dans le cas contraire, chaque chaîne attaquée en a livré 3.

Notons ici que nos calculs sur les fractions "protéique" et "non-protéique" ont été effectués dans deux cas extrêmes et nous pouvons dire que, pendant les 30 premières minutes de l'hydrolyse, chaque chaîne protéique attaquée a, en moyenne, certainement fourni 2-3 gros peptides (longueur moyenne: 32-45) et 2-3 petits peptides (longueur moyenne: 12).

4. Le partage des α -NH₂ de la valine et des autres aminoacides entre les deux fractions ne présente pas de caractéristiques assez nettes pour permettre des conclusions précises. Si l'on s'en tient au point de vue qualitatif cependant, il y a lieu de remarquer qu'aucun α -NH₂ n'est totalement absent de l'une des fractions.

Après 90 minutes d'hydrolyse:

1. La technique chromatographique permet, dans ce cas, de retrouver 30 α -NH₂ seulement dans 63 400 g d'hydrolysat alors que le dosage VAN SLYKE en décèle 37. Cette discordance est, en partie tout au moins, due à l'apparition de α -NH₂ dont le bilan ne fait pas état. Mais, en outre, nous avons toujours constaté que plus les milieux traités sont riches en α -NH₂ et moins la technique au FDNB est quantitative. Nous avons donc corrigé systématiquement les résultats afin de tenir compte de ces erreurs.

2. Signalons, sans qu'il soit besoin de redonner tous les détails du calcul, que la longueur moyenne des gros peptides de la fraction "protéique" a nettement diminué depuis l'essai précédent puisqu'elle n'est plus comprise qu'entre 19 et 23. Toutefois, le nombre de ces peptides est resté sensiblement constant.

Notons de plus que, si tous les $\alpha\text{-NH}_2$ valine de la fraction "protéique" sont attribués à des chaînes intactes, le poids de ces dernières ne représente plus que 10% du poids initial au lieu de 34.5% comme avant. En reprenant les deux alternatives précédentes, nous pouvons donc dire que, entre la 30° et la 90° min. d'hydrolyse: ou bien les gros peptides ont subi des ruptures donnant chaque fois naissance à un peptide plus court, mais encore "protéique", et un peptide "non-protéique"; ou bien la plupart des chaînes qui restaient intactes après 30 minutes d'hydrolyse ont donné des gros peptides tandis qu'un nombre sensiblement égal de ces peptides passait, après une dégradation convenable, dans la fraction "non-protéique".

3. Le nombre des peptides "non-protéiques" a évidemment beaucoup augmenté. En moyenne, chaque chaîne attaquée en a maintenant fourni 5 ou 6. Mais leur longueur moyenne n'a pas notablement varié (11-12). Au cours de la première phase il semble donc que les petits peptides détachés par l'enzyme aient une longueur moyenne sensiblement constante et, d'autre part, qu'ils ne subissent aucune dégradation ultérieure notable. Notons que, en mesurant les variations subies par le N-NH₂ et le N total de la fraction "non-protéique", BUTLER¹⁴ et WINNICK¹⁵ étaient déjà arrivés à des conclusions semblables pour l'hydrolyse pepsique de l'insuline et de la caséine. Le fait paraît donc assez général. Nous allons d'ailleurs en trouver immédiatement confirmation.

b. Deuxième phase de l'hydrolyse: lente dégradation ultérieure des peptides

Quand le rapport enzyme/substrat est égal à 1/3000, la première phase de l'hydrolyse, nous l'avons vu, transforme la protéine en peptides "non-protéiques" dont la longueur moyenne est de 11-12. Il est intéressant de savoir, d'une part, si cette même longueur moyenne est retrouvée quand l'hydrolyse est conduite au même point, mais avec plus d'enzyme, et, d'autre part, comment varie cette longueur pendant la deuxième phase de l'hydrolyse.

Le nombre des liaisons rompues est maintenant trop élevé pour que des résultats intéressants soient obtenus par la technique de SANGER. Mais l'azote "non-protéique" est alors suffisamment proche de l'azote total pour que la longueur moyenne des peptides puisse être déduite directement du dosage de l'azote VAN SLYKE dans les hydrolysats entiers.

Un tel calcul a été fait dans tous les cas possibles et les chiffres correspondants ont été réunis au Tableau VIII.

Quelques remarques peuvent alors être faites:

1. Bien que la technique utilisée soit ici différente, nous retrouvons sensiblement, au seuil de la deuxième phase, les peptides caractérisés précédemment. Nos conclusions antérieures s'en trouvent donc parfaitement confirmées.

2. Quelle que soit la quantité d'enzyme en jeu, la longueur moyenne des peptides au début de la deuxième phase semble toujours la même. Ce fait doit être rapproché d'un autre, à savoir que les $\alpha\text{-NH}_2$ mis en liberté avec un rapport enzyme/substrat de 1/3000 ne diffèrent pas sensiblement, quant à leur nature, de ceux libérés avec un rapport de 1/30. Quand on utilise beaucoup d'enzyme, les ruptures sont évidemment plus nombreuses par unité de temps, mais elles semblent se produire, pendant la première phase

TABLEAU VIII
LONGUEUR MOYENNE DES PEPTIDES "NON-PROTÉIQUES" PENDANT L'HYDROLYSE
DE LA GLOBINE DE CHEVAL

Proportions pondérales enzyme/substrat	Durée (heures)	NNP (en % de N total)	N-NH ₂ apparu (en % de N total)	Longueur moyenne des peptides "non-protéiques"
$1/30$ (1.87 unité pepsine pour 1 g de protéine)	$1\frac{1}{2}$	89	5.85	12.0
	$1\frac{1}{2}$	92	7.35	9.5
	3	95	8.95	7.9
	8	100	11.85	5.9
	14	100	13.35	5.3
	24	100	21.1	3.3
$1/150$ (0.37 unité pepsine pour 1 g de protéine)	$1\frac{1}{2}$	87	5.6	12.5
	$4\frac{1}{2}$	89	6.9	10.2
	8	89	9.0	7.8
	23	93	13.9	5.0
$1/3000$ (0.0187 unité pepsine pour 1 g de protéine)	24	97	6.7	10.5

de l'hydrolyse tout au moins, aux mêmes endroits que quand il y a peu d'enzyme. La formation de dodécapeptides (en moyenne) est donc un stade bien défini de la dégradation pepsique de la globine.

3. Au cours de la deuxième phase de l'hydrolyse, les peptides de la première phase sont repris de nouveau par l'enzyme pour être soumis à une lente dégradation. Au bout de 24 heures environ, cette dégradation ultérieure amène le mélange au stade tétratripeptide (rapport 1/30) ou pentapeptide (rapport 1/150; 0.37 unités pepsine par g de substrat).

4. Si l'on se demande maintenant pourquoi l'enzyme attaque plus lentement les peptides "non-protéiques" que les protéines ou les gros peptides intermédiaires, deux hypothèses peuvent être émises: ou bien la pepsine possède une affinité plus grande pour les gros agrégats peptidiques que pour les petits et l'on revient à l'ancienne conception des protéinases; ou bien les liaisons peptidiques pour lesquelles la pepsine a le plus d'affinité ont été rompues pendant la première phase et il ne reste plus, au cours de la deuxième phase, que des liaisons difficilement attaquables. Seules des expériences ultérieures permettront évidemment de préciser ce point.

B. Cas de l'albumine

A titre de comparaison, des hydrolysats pepsiques d'albumine ont été soumis aux mêmes techniques que précédemment. Mais, comme les chromatogrammes sont ici plus complexes, nous n'avons pas cherché à déterminer séparément les divers α -NH₂ et nous sommes contentés de doser les DNP dérivés après les avoir débarassés des artefacts (Tableau IX).

Les chiffres du Tableau IX montrent que la fraction "protéique" contient, dans ce cas encore, quelques α -NH₂. En plus des molécules intactes dont la présence semble

TABLEAU IX

$\alpha\text{-NH}_2$ DANS LES FRACTIONS "PROTÉIQUE" ET "NON-PROTÉIQUE" PENDANT L'HYDROLYSE
PEPSIQUE DE L'ALBUMINE

PROPORTIONS PONDÉRALES ENZYME/SUBSTRAT: 1/30; 1.87 UNITÉS PEPSINE PAR g DE PROTÉINE

Durée de l'hydrolyse (h)	NNP (en % de N total)	Nombre total de $\alpha\text{-NH}_2$ dans (P)* g de la		Longueur moyenne des peptides "non-protéiques"
		fraction "protéique"	fraction "non-protéique"	
$\frac{1}{6}$	20.0	3.0	12	6.6
	36.0	2.9	34	4.2
	79.0**	1.7	52	5.5

* Le symbole (P) indique, comme au Tableau VIII, le poids de la fraction considérée auquel 1 mol de protéine (45 000 g) a donné naissance dans les conditions de l'essai.

** Cet essai est de ceux pendant lesquels on assiste à une dégradation plus complète de l'albumine.

bien démontrée par les travaux de TISELIUS et MORING-CLAESSON, l'acide trichloracétique précipite donc quelques peptides "protéiques" dont la longueur, d'ailleurs, ne peut pas être calculée.

Notons d'autre part que les peptides "non-protéiques" sont tout de suite très courts et que leur longueur moyenne semble atteindre bientôt sa valeur minimum.

La longueur moyenne des peptides "non-protéiques" peut d'ailleurs être également calculée à partir de la teneur en $N\text{-NH}_2$ de ces peptides. Cette dernière est directement donnée par la formule suivante, déjà utilisée par MORING-CLAESSON¹³:

$$100 n_1 = NNP \cdot n_2 + (100 - NNP) n_3$$

où n_1 est le pour cent de $N\text{-NH}_2$ dans les hydrolysats entiers (pour cent de N total).

n_2 est le pour cent de $N\text{-NH}_2$ dans la fraction "non-protéique" (pour cent de N total).
et n_3 est le pour cent de $N\text{-NH}_2$ dans la fraction "protéique" (pour cent de N total).

n_2 est pris égal à 4.3 (teneur de la protéine intacte en $N\text{-NH}_2$), plus un certain facteur (d'ailleurs faible) tenant compte de la présence de quelques $\alpha\text{-NH}_2$ dans la fraction "protéique" (Tableau IX).

Nous avons rassemblé les résultats de ce calcul dans le tableau X.

TABLEAU X

LONGUEUR MOYENNE DES PEPTIDES "NON-PROTÉIQUES" PENDANT L'HYDROLYSE
PEPSIQUE DE L'ALBUMINE

PROPORTIONS PONDÉRALES ENZYME/SUBSTRAT: 1/30; 1.87 UNITÉS PEPSINE
PAR g DE PROTÉINE

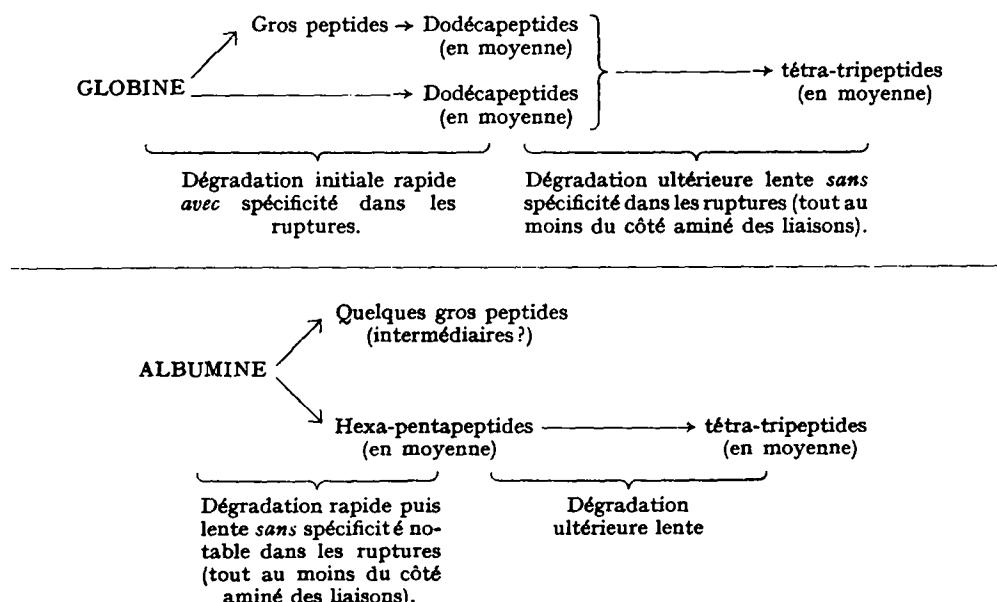
Durée de l'hydrolyse (h)	$N\text{-NH}_2$ dans l'hydrolysat entier (n_1) (en % de N total)	NNP (en % de N total)	Longueur moyenne des peptides "non-protéiques"
$\frac{1}{6}$	7.5	20.0	5.5
$\frac{1}{3}$	10.2	30.2	4.1
$1\frac{1}{2}$	11.4	38.5	4.3
3	12.5	42.8	4.1
8	14.6	47.0	3.5
13	15.7	49.2	3.3
24	16.5	54.5	3.4

L'ensemble des résultats expérimentaux des Tableaux IX et X montre que la pepsine n'attaque pas l'albumine comme elle attaque la globine. Dans un cas, en effet, nous voyons toutes les molécules de globine subir, au cours d'une première phase, une rapide dégradation qui donne naissance simultanément à de très gros peptides et (en moyenne) à des dodécapeptides. Les gros peptides sont également scindés en dodécapeptides et ce sont ces derniers que l'on trouve seuls au terme de la première phase. Pendant cette dégradation initiale, l'enzyme attaque manifestement certaines liaisons de préférence aux autres. Puis, au cours d'une deuxième phase, les dodécapeptides se transforment lentement en tétra-tripeptides. La spécificité de rupture s'atténue pendant cette deuxième phase et il apparaît, aux extrémités aminées des chaînes, de plus en plus d'aminoacides différents.

Dans l'autre cas, pour une raison d'ailleurs inconnue, une partie seulement des molécules d'albumine subit une dégradation initiale rapide. Mais les molécules attaquées sont tout de suite profondément morcelées. La longueur moyenne des peptides "non-protéiques" n'est en effet, dès le début de l'hydrolyse, que de 6 environ et tombe ensuite lentement à 3-4. La présence, pendant toute l'hydrolyse, de quelques peptides probablement plus longs peut, en outre, être décelée, mais il est difficile de dire si ces peptides sont ou non des produits intermédiaires de la dégradation.

Quoiqu'il en soit, nos résultats pour l'albumine sont d'accord, dans une certaine mesure, avec ceux de TISELIUS et ceux de MORING-CLAESSON. Avec ceux de TISELIUS, en ce sens que l'albumine est bien transformée par la pepsine en petits peptides sans que l'existence de produits intermédiaires puisse être nettement mise en évidence. Avec ceux de MORING-CLAESSON aussi, après la correction que nous leur avons apporté dans l'introduction, en ce sens que les peptides initialement formés semblent bien subir, de la part de l'enzyme, une légère dégradation ultérieure.

Voici, pour terminer, un schéma tentant de résumer les diverses modifications subies par la globine et l'albumine au cours de leur hydrolyse pepsique.



RÉSUMÉ

Au cours du présent travail, nous appliquons aux hydrolysats pepsiques de globine de cheval et d'albumine d'œuf, ainsi qu'à leurs fractions "protéique" et "non-protéique", les techniques de SANGER (1.2.4-fluorodinitrobenzène), de l'oxydation périodique et de VAN SLYKE. Nous montrons que:

1. L'hydrolyse pepsique de la globine de cheval se fait en deux phases successives.
2. Pendant la première phase, les chaînes de la protéine donnent simultanément naissance à de très gros peptides et à des dodécapeptides (en moyenne). Les gros peptides sont également transformés en dodécapeptides. Ces derniers représentent donc un stade bien défini dans l'attaque pepsique de la globine de cheval.
3. Pendant cette première phase, la pepsine rompt préférentiellement les liaisons dans lesquelles l'alanine, la phénylalanine, la leucine et la sérine sont impliquées par leur fonction amine. La spécificité du côté carboxyle des liaisons n'a pu malheureusement être encore étudiée.
4. Pendant la seconde phase, les peptides précédents subissent une lente dégradation qui les amène au stade tétra-tripeptides (en moyenne). Au cours de cette attaque ultérieure, la pepsine ne semble pas manifester une spécificité notable (du côté aminé des liaisons tout au moins).
5. L'hydrolyse pepsique de l'albumine d'œuf ne présente pas les mêmes caractères. L'existence de peptides intermédiaires entre les molécules intactes et les produits ultimes de dégradation n'apparaît pas nettement. Dès le début de l'hydrolyse, il se forme des hexa-penta peptides (en moyenne) qui ne subissent ensuite qu'une faible dégradation ultérieure.
6. Chaque molécule d'albumine attaquée étant immédiatement dégradée de façon profonde, il est normal de prévoir qu'aucune spécificité de rupture ne puisse se manifester. C'est bien ce que l'on constate en effet, du côté aminé des liaisons rompues tout au moins.

SUMMARY

In this paper the techniques of SANGER (1.2.4-fluorodinitrobenzene), of periodate oxidation and of VAN SLYKE were applied to peptic hydrolysates of horse globin and egg albumin. It was shown that:

1. The hydrolysate of horse globin is formed in two successive phases.
2. During the first phase of the degradation of horse globin very large peptides and dodecapeptides (average) are formed simultaneously from the protein chains. The large peptides are also transformed into dodecapeptides. The latter therefore represent a definite stage in this degradation.
3. During this first phase the pepsin breaks up preferentially those bonds in which alanine, phenylalanine, leucine and serine are involved through their amino-groups. Unfortunately it has not yet been possible to investigate the specificity of the carboxyl moiety in these bonds.
4. During the second phase the peptides undergo a further degradation until the stage tetra-tripeptides (average). In this later attack pepsin does not seem to display any notable specificity (at least at the amino-side of the bonds).
5. The peptic hydrolysis of egg albumin shows different characteristics. The existence of peptides as intermediates between the intact molecules and the end-products of the degradation is not evident. From the very beginning of the hydrolysis hexa-penta peptides (average) are formed which undergo only slight subsequent degradation.
6. As each albumin molecule is immediately extensively degraded it could be anticipated that no specificity of break-down would appear. This is the case, at least as far as the amino-groups of the broken bonds are concerned.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden auf Pepsinhydrolysate von Pferdeglobin und Eieralbumin, sowie auf deren "Protein" — und "Nicht-protein" — Fraktionen die Methode von SANGER (1.2.4-Fluorodinitrobenzol), die Perjodatoxydation und die VAN SLYKE'sche Arbeitstechnik angewendet. Es wurde gezeigt:

1. Die Pepsinhydrolyse des Pferdeglobins geht in zwei aufeinanderfolgenden Phasen vor sich.
2. Während der ersten Phase entstehen aus den Eiweißketten sehr grosse Peptide und Dodekapeptide (durchschnittlich). Die grossen Peptide werden ebenfalls in Dodekapeptide verwandelt. Letztere stellen also ein wohl definiertes Stadium im Pepsinabbau des Pferdeglobins dar.
3. Während der ersten Phase spaltet das Pepsin vorzugsweise diejenigen Bindungen, an denen Alanin, Phenylalanin, Leucin, und Serin mit ihren Aminogruppen beteiligt sind. Die Spezifität dieser Bindungen auf der Carboxylseite konnte leider noch nicht untersucht werden.
4. Während der zweiten Phase erfahren diese Peptide einen langsamen Abbau bis zum Stadium Tetra-Tripeptide (durchschnittlich). Während dieses späteren Angriffes scheint das Pepsin nicht spezifisch zu wirken (jedenfalls nicht an den, an den Bindungen beteiligten Aminogruppen).

5. Die Pepsinhydrolyse des Eieralbumins zeigt einen anderen Charakter. Zwischen den unverehrten Molekülen und den endgültigen Abbauprodukten treten Peptide als Zwischenprodukte nicht deutlich auf. Gleich zu Beginn der Hydrolyse entstehen Hexa-Pentapeptide (durchschnittlich), die dann nur noch wenig abgebaut werden.

6. Da jede Albuminmolekel sofort weitgehend abgebaut wird, war vorauszusehen, dass sich keine Spezifität in der Spaltung der verschiedenen Bindungen zeigen würde. Dies war auch der Fall, jedenfalls was die an den Bindungen beteiligten Aminogruppen betrifft.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. S. FRUTON ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 627.
- ² M. BERGMANN ET J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.*, 118 (1937) 405.
- ³ M. BERGMANN, J. S. FRUTON ET H. POLLOCK, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 643.
- ⁴ K. HOFMANN ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 81.
- ⁵ M. BERGMANN, *Advances in Enzymol.*, 2 (1942) 49.
- ⁶ C. R. HARRINGTON ET R. V. PITTS-RIVERS, *Nature*, 154 (1944) 301.
- ⁷ J. LENS, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 367.
- ⁸ T. A. LAINE, *Thèse*, Helsinki 1944.
- ⁹ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ¹⁰ P. DESNUELLE ET A. CASAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 64.
- ¹¹ A. TISELIUS ET I. B. ERICKSSON-QUENSEL, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1752.
- ¹² G. HAUGAARD ET R. M. ROBERTS, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 2664.
- ¹³ I. MORING-CLAESSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 389.
- ¹⁴ J. A. V. BUTLER, E. C. DODDS, D. M. P. PHILLIPS ET J. M. L. STEPHEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 122.
- ¹⁵ T. WINNICK, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 465.
- ¹⁶ E. J. CONWAY ET E. O'MALLEY, *Biochem. J.*, 36 (1942) 655.
- ¹⁷ B. E. CHRISTENSEN, E. S. WEST ET K. P. DIMICK, 137 (1941) 734.
- ¹⁸ M. W. REES, *Biochem. J.*, 40 (1946) 632.
- ¹⁹ P. DESNUELLE, S. ANTONIN ET M. NAUDET, *Bull. Soc. chim. biol. (Trav.)*, 26 (1944) 1168.
- ²⁰ B. ALEXANDER ET A. M. SELIGMAN, *J. Biol. Chem.*, 1945 (1959) 8.
- ²¹ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1939) 79.
- ²² R. A. KEKWICK ET R. K. CANNAN, *Biochem. J.*, 30 (1936) 227.
- ²³ A. C. CHIBNALL, *Proc. Roy. Soc. (London)*, 131 (1942) 136.
- ²⁴ H. NEURATH, J. P. GREENSTEIN, F. W. PUTMAN ET J. O. ERICKSON, *Chem. Rev.*, 34 (1944) 157.
- ²⁵ G. S. ADAIR ET G. M. ADAIR, *Biochem. J.*, 28 (1934) 1230.
- ²⁶ J. ROCHE ET R. COMBETTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 19 (1937) 627.
- ²⁷ W. T. ASTBURY, *Advances in Enzymol.*, 3 (1943) 63.
- ²⁸ R. R. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- ²⁹ R. CONSDEN, A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 41 (1947) 596.
- ³⁰ G. R. TRISTRAN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 721.
- ³¹ A. J. V. BUTLER, D. M. P. PHILLIPS ET J. M. L. STEPHEN, *Nature*, 162 (1948) 418.
- ³² A. J. V. BUTLER, E. C. DODDS, D. M. P. PHILLIPS ET J. M. L. STEPHEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 116.

Reçu le 19 juillet 1949