

NOUVELLES RECHERCHES SUR L'HYDROLYSE PRÉFÉRENTIELLE DES LIAISONS SÉRINE ET THRÉONINE DANS LES PROTÉINES

par

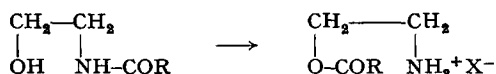
P. DESNUELLE ET G. BONJOUR

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

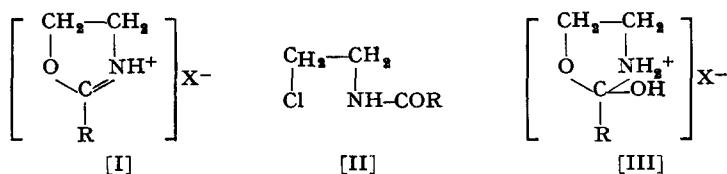
L'hydrolyse spécifique, ou tout au moins préférentielle, de certaines liaisons peptidiques au sein des protéines représente un vaste problème dont l'étude est à peine amorcée. Son intérêt, cependant, semble considérable. Si nous savions, en effet, rompre les chaînes peptidiques, non plus au hasard, mais en des points déterminés à l'avance, nous connaîtrions mieux la structure de ces chaînes et nous formerions peut-être dans certains cas des peptides biologiquement actifs.

Quand on traite des protéines¹ ou des modèles simples de ces molécules², par une solution aqueuse concentrée d'acide chlorhydrique, on constate que l'hydrolyse de toutes les liaisons peptidiques ne progresse pas à la même vitesse. Celle des liaisons sérine et thréonine* est, de loin, la plus rapide. Or, ces dernières liaisons ne se différencient des autres que par la présence d'une fonction hydroxyle en α . C'est donc dans cette structure α -oxyamide qu'il convient de rechercher l'origine de leur labilité.

Les α -oxyamides simples sont, on le sait, susceptibles de se transposer en esters α -aminés



par l'intermédiaire, semble-t-il, soit d'un sel d'oxazoline⁴ [I], soit de leur dérivé α chloré⁵ [II], soit, enfin, d'une forme cyclique tautomère⁶ [III].



Si, sous l'influence de l'acide chlorhydrique concentré, une telle transposition se produisait au niveau des "restes" sérine et thréonine des protéines, les liaisons de ce type, primitivement sous la forme amide, seraient transformées en liaisons ester beaucoup plus labiles. On comprendrait alors que leur hydrolyse soit particulièrement rapide.

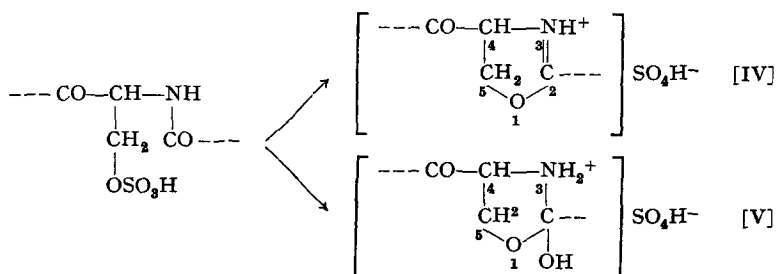
* Nous avons proposé³, par analogie avec la nomenclature des peptides, d'appeler liaison *sérine* (par exemple) toute liaison peptidique dans laquelle la sérine se trouve impliquée par sa fonction amine. Toute liaison aboutissant au carboxyle de ce même amino-acide est alors dénommée liaison *séryle*.

Que cette hypothèse soit exacte ou non, elle suggère l'idée d'étudier systématiquement l'action exercée sur les protéines par les réactifs de transposition des α -oxyamides simples. Ces réactifs sont de deux sortes :

a. *Certains acides concentrés*, comme l'acide chlorhydrique aqueux⁷, dans l'alcool^{8,9} ou dans les solvants apolaires¹⁰, et l'acide sulfurique. L'acide chlorhydrique aqueux ayant déjà fait l'objet d'une étude de notre part et les solvants apolaires ne semblant guère convenir aux molécules protéiques, il reste donc à envisager, pour ce qui concerne ce premier groupe, l'acide chlorhydrique dans l'alcool et l'acide sulfurique concentré.

b. *Le chlorure de thionyle*, qui est le plus classique des réactifs de transposition. Grâce à lui, la *O*-benzoylsérine⁴ et la *O*-stéaroyléthanolamine¹¹ ont été préparées avec un excellent rendement à partir des oxyamides correspondants. Ce réactif, d'ailleurs, semble d'autant plus intéressant qu'il ne doit pas, en principe, provoquer d'hydrolyse au sein des molécules protéiques*. Si les liaisons sérine et thréonine pouvaient ainsi être transposées avant que les autres liaisons peptidiques aient commencé à se rompre, la spécificité de leur hydrolyse ultérieure s'en trouverait, de toute évidence, considérablement augmentée.

En outre, une observation récente de REITZ et coll.¹² a retenu notre attention. Cherchant un réactif spécifique des hydroxyles protéiques, les auteurs précédents ont traité les protéines par SO_4H_2 anhydre et froid. Ce dernier a bien pour effet d'estérifier tout d'abord les hydroxyles protéiques sans provoquer, semble-t-il, d'autres modifications. Toutefois, si les protéines sont laissées longtemps en contact avec l'acide, on constate que les radicaux sulfate ne s'y trouvent plus en liaison ester mais en liaison saline. Peut-être les esters sulfuriques, formés dans un premier temps, se sont-ils alors transformés en sulfates d'oxazoline [IV] ou en sulfates de la forme tautomère de l'amide [V],



susceptibles de s'ouvrir ultérieurement entre le carbone 2 et l'azote 3. Dans cette hypothèse, l'acide sulfurique anhydre serait à rapprocher du chlorure de thionyle, en ce sens que, sans provoquer d'hydrolyse, il serait éventuellement capable de placer les liaisons sérine et thréonine sous une forme instable.

On trouvera ci-après la description des essais réalisés dans ces divers domaines et les résultats obtenus.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Hydrolyse par HCl concentré en solution aqueuse

Nous avons tout d'abord repris quelques unes de nos expériences précédentes¹ afin

* Tel n'est évidemment pas le cas avec les divers acides du groupe (a).

de préciser nettement l'index de spécificité* susceptible d'être obtenu avec HCl aqueux. De la globine de cheval pure** (200 mg), préparée à partir de l'hémoglobine cristallisée correspondante, a donc été traitée à 20° dans HCl 12 N (10 ml) pendant 7, 20 et 41 h. L'acide a ensuite été chassé sous vide et les effets de l'hydrolyse ont été étudiés par les techniques de VAN SLYKE ET SANGER¹³ (Tableau I).

TABLEAU I
INDEX DE SPÉCIFICITÉ DES LIAISONS SÉRINE ET THRÉONINE PENDANT
L'HYDROLYSE DE LA GLOBINE PAR HCl 12 N à 20°

Durée de l'hydrolyse (h)	Liaisons totales hydrolysées*	Liaisons déterminées par la technique de SANGER							Index de spécificité	
		Sérine		Thrénine		Autres**		Total (Nb)	Sérine	Thrénine
		Nb	%	Nb	%	Nb	%			
7	59	17.2	48	8.4	35	20	4	45.6	12.0	8.8
20	114	30.5	85	19.9	83	59.5	12	109.9	7.1	6.9
41	151	37.0	103	20.6	86	74	15	131.6	6.9	5.7

* Calculées à partir des résultats du dosage VAN SLYKE en leur retranchant 50% du N-NH₃ et en leur ajoutant ce qui revient à l'hydrolyse des liaisons de la proline.

** Le nombre de ces "autres liaisons" a été déterminé en éluant les DNP-dérivés autres que la DNP-sérine et la DNP-thrénine, en retranchant la DNP-valine initiale puis en appliquant à la différence un coefficient de pente "moyen".

Les résultats du Tableau I confirment bien ceux de notre précédente publication. Au bout de 20 h, l'acide chlorhydrique a hydrolysé 85% des liaisons sérine et 83% des liaisons thrénine tandis qu'il n'a encore touché que 12% seulement des autres liaisons peptidiques. Au début du traitement, l'hydrolyse des liaisons sérine s'effectue 12 fois plus vite que celle des autres liaisons. Puis, comme il est d'ailleurs normal de le prévoir, la spécificité tend à diminuer. Notons en outre que l'index de spécificité relatif aux liaisons thrénine est toujours légèrement inférieur à celui des liaisons sérine.

2. Hydrolyse par HCl dans le méthanol

L'acide chlorhydrique dans l'alcool absolu est utilisé de façon courante pour transformer les protéines en leurs chlorhydrates d'esters. A l'heure actuelle, on emploie dans ce but des solutions acides très diluées (0.02-0.1 N)¹⁵ car les solutions concentrées provoquent, en dehors de l'estérification proprement dite, une dégradation très notable des molécules protéiques¹⁶. Peut-être cette dégradation intéresse-t-elle principalement les liaisons sérine et thrénine puisque, comme nous l'avons déjà noté, l'acide chlorhydrique dans l'alcool passe pour transposer aisément les oxyamides simples. Nous avons donc étudié l'hydrolyse (ou plutôt l'alcoololyse) de la globine par HCl en solution dans l'alcool (Tableau II).

* Rappelons que l'index de spécificité relatif à l'hydrolyse d'une liaison d'un certain type est défini³ comme étant le rapport du pourcentage d'hydrolyse des liaisons de ce type sur le pourcentage d'hydrolyse des autres liaisons envisagées globalement.

** On trouvera dans une publication précédente¹⁴ la composition de la globine qui a servi de base à nos calculs. Quant à l'édestine dont il est fait mention un peu plus loin, nous avons admis qu'elle renfermait 30 liaisons sérine, 16 liaisons thrénine et 430 liaisons totales par mol.

TABLEAU II

INDEX DE SPÉCIFICITÉ DES LIAISONS SÉRINE ET THRÉONINE PENDANT
L'HYDROLYSE DES PROTÉINES PAR HCl DANS LE MÉTHANOL

- I. Solution saturée à 20° de HCl dans le méthanol absolu. Température pendant l'hydrolyse: 20°
 II. Même solution acide que (I). Température pendant l'hydrolyse (en tube scellé): 70°
 III. Solution saturée à 20° de HCl dans le méthanol à 90%. Température pendant l'hydrolyse: 20°

Hydrolyse		Liaisons totales hydrolysées (VAN SLYKE)	Liaisons déterminées par la technique de SANGER							Index de spécificité	
Type	Durée (h)		Sérine		Thréonine		Autres		Total (Nb)	Sérine	Thréonine
			Nb.	%	Nb	%	Nb	%			
I	3	54	10.7	30	5.8	24	13.9	2.8	30.4	10.7	8.6
	24	141	18.3	51	12.8	53	62.0	12.5	93.1	4.1	4.2
	48	175	26.5	74	16.5	69	89.0	17.9	132.0	4.1	3.8
II	½	164	20.2	56	14.5	60	96.0	19.3	130.7	2.9	3.1
III	4	65	8.3	23	5.4	22	17.4	3.5	31.1	6.5	6.3

L'examen des chiffres du Tableau II montre que l'alcoolyse ne présente pas vis à vis des liaisons sérine et thrénine une spécificité plus grande que l'hydrolyse par HCl aqueux. Dans les meilleures conditions, en effet, l'index ne dépasse pas 11 pour les premières et 9 pour les secondes.

3. Traitement des protéines par SOCl_2 suivi d'une hydrolyse acide

De la globine bien anhydre (200 mg) est traitée par SOCl_2 fraîchement distillé (5 ml), soit à la température ordinaire, soit à 50°. Après ce traitement, au cours duquel la protéine ne se dissout d'ailleurs pas de manière sensible, on chasse soigneusement le réactif sous vide puis on hydrolyse le résidu par HCl dilué (Tableau III).

Les chiffres du Tableau III montrent que le chlorure de thionyle n'exerce pas une

TABLEAU III

INDEX DE SPÉCIFICITÉ DES LIAISONS SÉRINE ET THRÉONINE DANS LA GLOBINE
PRÉALABLEMENT TRAITÉE AU CHLORURE DE THIONYLE

Traitement de la protéine	Liaisons rompues				Index de spécificité des liaisons sérine
	Sérine		Autres		
	Nb	%	Nb	%	
2 h dans SOCl ₂ à 20° puis 1 h dans HCl 0.2 N bouillant	12.9	35.8	25.5	4.8	7.4
2 h dans SOCl ₂ à 50° puis 1 h dans HCl 0.2 N bouillant	13.2	36.8	27.0	5.1	7.1
1 h dans HCl 0.2 N bouillant (à titre de comparaison)	5.4	15.0	13.5	2.6	5.1

action bien notable sur les liaisons sérine et thréonine des protéines. Cet échec nous semble dû principalement au fait que les protéines sont insolubles dans le réactif tandis que les oxyamides simples, étudiées jusqu'à maintenant, s'y dissolvent instantanément. Il ne faut pas oublier, de plus, que la structure rigide des chaînes peptidiques peut également interdire certains remaniements dont la réalisation est aisée au sein de molécules plus simples.

4. *Hydrolyse de la globine par SO_4H_2 10 N*

L'acide chlorhydrique concentré en solution aqueuse nous ayant, somme toute, donné de bons résultats, nous avons résolu d'étudier, à titre de comparaison, l'hydrolyse des liaisons sérine et thréonine par l'acide sulfurique concentré. Une solution de globine (200 mg) dans SO_4H_2 10 N (5 ml) a donc été conservée 24 h à 20°, neutralisée avec précaution puis traitée selon nos méthodes habituelles. Le pourcentage d'hydrolyse des liaisons sérine et thréonine atteignait respectivement, 22.6 et 21.0, tandis que celui relatif aux autres liaisons ne dépassait pas 2.6. La spécificité (index: 8.7 et 7.8), toutefois, n'était pas meilleure qu'en présence d'HCl concentré.

5. *Traitement de la protéine par SO_4H_2 anhydre suivi d'une hydrolyse acide*

Nous avons déjà signalé au début de ce travail que l'estérification des fonctions hydroxyle protéiques par SO_4H_2 anhydre est suivie d'un deuxième phénomène, de nature encore inconnue, au cours duquel les esters sulfuriques primitifs cèdent la place à des sulfates salins. Si ce deuxième phénomène consiste, comme nous l'avons supposé, en la formation de cycles instables, il est peut-être susceptible de nous fournir le moyen, vainement recherché avec le chlorure de thionyle, de labiliser les liaisons sérine et thréonine avant que la protéine ne commence à s'hydrolyser.

La protéine (1 g), bien anhydre et réduite en poudre fine, est humectée par l'alcool absolu (3 ml)* dans un petit récipient rodé. Le mélange est refroidi à -20° puis il est additionné d'acide sulfurique (20 ml) fraîchement distillé et refroidi au préalable à -25°. Le récipient est hermétiquement bouché, il est agité vivement et il est enfin placé dans un dessiccateur à la température ordinaire. La protéine forme quelquefois une phase gélifiée qui flotte à la surface de l'acide. Il est alors nécessaire d'agiter le tube plusieurs fois par jour jusqu'à solubilisation complète.

Après un délai variable, atteignant généralement une semaine, le contenu du tube, qui se présente à ce moment comme un liquide homogène, visqueux et légèrement ambré, est versé, sous violente agitation, dans un large excès d'éther anhydre à 0°. Le précipité formé est centrifugé puis il est lavé à l'éther et à l'acétone anhydre jusqu'à élimination complète de l'acide. Un séchage sous vide donne une poudre fine presque incolore.

Avant d'entamer l'étude de cette poudre et de son hydrolyse, signalons que nous avons traité par SO_4H_2 anhydre soit de la sérine pure soit un mélange d'acides-amino contenant une quantité connue de sérine. La précipitation ultérieure à l'éther est évidemment impossible dans ce cas. Les solutions¹² ont donc été versées doucement sur de la glace pilée puis neutralisées avec soin. Après traitement au FDNB et hydrolyse par HCl 6 N bouillant pendant 18 h, nous avons dans les deux cas retrouvé la quantité attendue de DNP-sérine. Ce fait montre que l'acide sulfurique anhydre ne détruit pas la sérine et qu'il ne forme pas non plus, à partir d'autres acides-amino, des artefacts susceptibles d'être confondus avec la sérine sur les colonnes chromatographiques.

* Afin de faciliter le mouillage ultérieur par SO_4H_2 ¹³.

Cette remarque préliminaire étant faite, étudions l'hydrolyse acide de la poudre (Tableau IV).

L'examen des résultats rassemblés dans le Tableau IV suggère les quelques commentaires suivants:

1. Le long séjour dans SO_4H_2 anhydre a considérablement augmenté la labilité des liaisons sérine et thréonine. Il est d'ailleurs difficile de se faire une idée absolument exacte de cette augmentation, car, malgré les précautions prises, les protéines subissent déjà une légère dégradation pendant le traitement sulfurique. Nos chiffres traduisent donc l'effet combiné de ce traitement et de l'hydrolyse qui lui fait suite*.

2. Quoi qu'il en soit, on ne peut manquer d'être frappé par les valeurs élevées prises, dans ces nouvelles conditions, par les index de spécificité. Au cours de l'un de nos essais avec l'édestine, par exemple, les liaisons sérine s'hydrolysent 70 fois plus vite que les autres liaisons. La spécificité est donc, pour ces liaisons, améliorée d'environ 7 fois par rapport à nos précédentes expériences. Les index relatifs aux liaisons thréonine, bien qu'ils soient également augmentés par le traitement, n'atteignent cependant pas des valeurs aussi fortes. Tout semble se passer comme si la présence d'un méthylène supplémentaire dans la chaîne latérale des "restes" thréonine ralentissait le processus activateur.

Il est à noter, d'ailleurs, que le bénéfice susceptible d'être tiré du traitement sulfurique varie suivant la nature de la protéine en jeu. L'albumine d'oeuf, par exemple, dont la dégradation préliminaire est importante, s'hydrolyse ultérieurement de façon moins spécifique que l'édestine.

3. Avec cette dernière protéine, nous avons effectué de très nombreux essais. Ils montrent que les conditions de l'hydrolyse ultérieure exercent une grande influence sur la spécificité. Celle-ci est beaucoup moins bonne, par exemple, en milieu peu acide qu'en milieu très acide. Le fait n'est d'ailleurs pas surprenant car on sait que les acides faibles manifestent une spécificité qui leur est propre, dirigée vers les liaisons de l'acide aspartique¹⁷. Mais, même avec les acides forts, la température et la concentration de l'acide jouent un rôle déterminant. $\text{HCl } 6 \text{ N}$ à 30° donne de très bons résultats.

4. Toutes les liaisons sérine et thréonine ne semblent pas pouvoir être activées par le traitement sulfurique. On constate en effet que la vitesse de leur hydrolyse tend, au moment où sont rompus 60–75 % des premières et 20–30 % des secondes, à se rapprocher de la normale.

5. La rupture des liaisons sérine et thréonine, suivie jusqu'ici par condensation avec FDNB, peut aussi, rappelons-le, être étudiée par oxydation périodique. Dans le premier travail de cette série¹, nous avons déjà utilisé comparativement les deux techniques et nous avons trouvé que la première donne généralement des résultats un peu plus élevés que la seconde. Ce fait, d'ailleurs, peut être considéré comme un argument en faveur de l'hypothèse de la transposition. Si, en effet, la transposition n'est pas toujours suivie de l'hydrolyse immédiate de l'ester auquel elle donne naissance, il doit exister, au niveau de certains "restes" sérine ou thréonine, des NH_2 libres susceptibles de se

* L'état de la protéine simplement traitée à l'acide sulfurique et non-encore hydrolysée est difficile à préciser car il varie selon les préparations. Il varie, de plus, par une sorte de processus "d'autolyse", en fonction du temps. On peut dire toutefois que le traitement à l'acide sulfurique anhydre, même prolongé pendant une semaine, ne provoque pas généralement une dégradation bien sensible des liaisons peptidiques. Parmi les protéines que nous avons étudiées, l'édestine et la fibroïne semblent subir une hydrolyse d'environ 2–3 %. La dégradation de la globine de cheval et de l'albumine d'oeuf, par contre, semble être plus importante. Notons d'ailleurs que l'on retrouve, au cours de ce processus préliminaire, les caractéristiques de l'hydrolyse par SO_4H_2 concentré, avec un index de spécificité pour les liaisons sérine et thréonine de 10 environ.

TABLEAU IV
HYDROLYSE ACIDE DES PROTÉINES TRAITÉES PRÉALABLEMENT À L'ACIDE SULFURIQUE ANHYDRE

Protéine étudiée	No échantillon	Hydrolyse		N-NH ₂ (en % de N total)	Liaisons rompues étudiées par la méthode SANGER								Index de spécificité			
					Sérine		Thréonine		Autres							
		Conditions			Durée (h)		Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Sérine	Thréonine
Edestine	1	eau à 100° HCl 6 N à 18°		1/2 3	6.13 6.06	8.5 14.4	28.3 48.0	1.9 3.8	11.9 23.7	3.6 3.5	0.95 0.90	14.0 21.7	30 53	13 26		
	2	HCl 6 N à 18° HCl 12 N à 18° HCl 12 N à 18°		6 3 6	7.59 8.05 8.64	21.4 22.6 22.6	71.5 75.5 75.5	5.2 4.1 4.3	32.5 25.6 26.9	3.9 5.4 7.3	1.0 1.4 1.9	30.5 32.1 34.2	71 54 40	32 18 14		
	3	CH ₃ COOH 2 N à 100°		3	7.00	16.7	55.5	2.8	17.5	5.5	1.4	25.0	40	12		
	4	Milieu à pH = 2 et 50° HCl 12 N à 18° HCl 12 N à 30°		24 18 11	5.07 9.78 11.4	13.0 18.0 13.4	43.4 60.0 44.7	2.7 6.4 5.5	16.9 40.0 34.4	3.8 7.9 6.5	1.0 2.1 1.7	19.5 32.3 25.4	43 29 26	17 19 20		
	5	Milieu à pH = 2 et 50° HCl 6 N à 0° HCl 6 N à 30°		72 16 12	4.71 5.90 7.08	11.7 9.4 17.4	39.1 31.3 58.0	1.9 1.5 4.4	11.9 9.4 27.5	4.4 4.3 5.3	1.15 1.1 1.4	18.0 15.2 27.1	34 29 41	10 9 20		
Albumine d'oeuf cristallisée	6	HCl 6 N à 30°		6	14.7	41.7	119	8.3	53.0	25.5	7.3	75.5	16	7		
	7	HCl 6 N à 20°		6	10.0	21.3	61.0	4.9	31.5	13.1	3.7	39.3	17	9		

condenser avec FDNB (donc de fournir ultérieurement de la DNP-sérine ou de la DNP-thréonine) mais dépourvus de ces hydroxyles en α dont la présence conditionne l'oxydation périodique. Que, dans le cas présent, les deux techniques fournissent des résultats notablement différents (20-30% environ), n'est pas pour nous surprendre; certains hydroxyles, d'une part, peuvent être sulfatés. D'autre part, l'effet principal du traitement sulfurique est, pensons-nous, de favoriser la transposition amide-ester. La probabilité pour qu'on rencontre dans les chaînes peptidiques des formes déjà transposées mais non encore hydrolysées, est donc plus forte que d'habitude*.

6. Une discussion analogue peut être ouverte pour ce qui concerne la détermination du degré d'hydrolyse, c'est-à-dire du nombre total des liaisons peptidiques rompues au sein de la protéine. Deux techniques sont ici utilisables, dont les résultats sont généralement concordants^{3,14}: soit calculer ce nombre à partir des données du dosage VAN SLYKE, soit faire la somme, après une correction convenable, des α DNP-amino-acides trouvés au cours de la technique SANGER. Dans le cas présent, les résultats VAN SLYKE sont systématiquement plus forts que les résultats SANGER. Ce nouveau désaccord semble pouvoir également s'expliquer, en grande partie tout-au-moins, par les modifications de structure provoquées par le traitement sulfurique au niveau des "restes" sérine et thréonine. La forme intermédiaire de la transposition, en effet, peut fort bien donner naissance (en milieu acétique) à une fonction NH_2 titrable pendant le dosage VAN SLYKE et n'en pas donner (en milieu alcalin) pendant la condensation avec FDNB.

Cette interprétation est rendue vraisemblable par l'expérience suivante: De la N-benzoylsérine cristallisée est traitée par SO_4H_2 anhydre pendant 8 jours. Après dilution et neutralisation à une température n'excédant pas 0° , les deux techniques sont appliquées au milieu. Celui-ci renferme 16% de son azote sous une forme titrable par VAN SLYKE mais il ne donne naissance à aucune trace de DNP-sérine.

7. Nous avons cherché à éviter la dégradation préliminaire subie par les protéines pendant le traitement sulfurique. Pensant que ce phénomène était dû, malgré les précautions prises, à la présence de traces d'eau, nous avons remplacé l'acide sulfurique anhydre par l'oléum à 5% d'anhydride. Les chiffres du Tableau V montrent que les résultats n'en sont notablement pas modifiés.

L'alcool, d'autre part, avec lequel nous humectons la protéine, provoque un im-

TABLEAU V
ETUDES DES PROTÉINES TRAITÉES PAR L'OLÉUM

Protéine	Hydrolyse ultérieure		Liaisons rompues (Méthode SANGER)						Index de spécificité	
	Conditions	Durée (h)	Sérine		Thréonine		Autres		Sérine	Thréonine
			Nb	%	Nb	%	Nb	%		
Edestine	—	0	9.4	31.4	1.4	8.8	2.3	0.6	52	15
	HCl 6 N à 18°	6	13.3	44.4	3.0	18.7	4.4	1.1	40	17
Albumine d'œuf	HCl 6 N à 18°	6	16.0	46.0	4.9	32.0	7.5	2.1	22	15

* Dans cette hypothèse, les index de spécificité précédemment indiqués seraient un peu trop forts puisqu'ils correspondraient à la transposition des liaisons sérine ou thréonine, et non à leur rupture. L'essentiel de nos conclusions resterait toutefois parfaitement valable.

portant dégagement de chaleur au moment de l'addition de l'acide sulfurique. Nous l'avons remplacé par l'acétone qui ne présente pas cet inconvénient. Aucun bénéfice particulier n'en a été retiré.

8. Notons enfin qu'un traitement sulfurique aussi prolongé provoque certainement, au sein des molécule protéiques, bien d'autres modifications que celles envisagées ici. Les "restes" aromatiques, par exemple, doivent se sulfoner. Ces autres modifications, sortant du cadre que nous nous étions tracé, n'ont pas fait l'objet d'une étude particulière.

RÉSUMÉ

Au cours du présent travail, nous avons cherché à augmenter la spécificité de l'hydrolyse des liaisons sérine et thréonine, spécificité dont nous avions déjà constaté l'existence pendant le traitement des protéines par HCl concentré en solution aqueuse. L'emploi de HCl en solution alcoolique ou de SO_4H_2 10 N, un traitement préliminaire des protéines par SOCl_2 , ne nous ont pas permis d'améliorer de façon sensible les résultats déjà acquis. Par contre, un traitement prolongé par SO_4H_2 anhydre modifie la structure des liaisons sérine et, dans une moindre mesure, la structure des liaisons thréonine de façon telle que l'hydrolyse ultérieure de ces liaisons devient beaucoup plus spécifique. Dans l'édestine ainsi traitée, par exemple, HCl 6 N à 18° hydrolyse (jusqu'à concurrence de 75%) les liaisons sérine 70 fois plus vite que les autres liaisons.

SUMMARY

In the course of the present work an attempt has been made to augment the specificity of the hydrolysis of serine and threonine bonds. The existence of this specificity was previously established during the treatment of the proteins with concentrated HCl in aqueous solution. Neither the use of HCl in alcoholic solution nor of 10 N H_2SO_4 , nor a preliminary treatment of the proteins with SOCl_2 , improved the results already obtained in any detectable way. In contrast, prolonged treatment with anhydrous H_2SO_4 modifies the structure of the serine bonds and, to a lesser extent, that of the threonine bonds in such a way that the further hydrolysis of these bonds becomes much more specific. For example, in edestin so treated 6 N HCl at 18° C hydrolyses (to the extent of 75%) serine bonds 70 times more rapidly than other bonds.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Versuch gemacht, die Spezifität der Hydrolyse der Serin- und Threoninbindungen zu erhöhen. Diese Spezifität war bereits bei der Behandlung der Proteine mit konz. Salzsäure in wässriger Lösung festgestellt worden. Weder durch Anwendung von HCl in alkoholischer Lösung oder von 10 N H_2SO_4 , noch durch Vorbehandlung der Proteine mit SOCl_2 konnten die bereits erzielten Resultate nachweisbar verbessert werden. Dagegen verändert eine längere Behandlung mit wasserfreier H_2SO_4 die Struktur der Serinbindungen und in gewissem Masse auch die Struktur der Threoninbindungen und zwar so, dass die darauf folgende Hydrolyse dieser Bindungen viel spezifischer wird. So werden z.B. im Edestin nach dieser Behandlung die Serinbindungen 70mal schneller mit 6 N HCl bei 18° (bis 75%) hydrolysiert als die anderen Bindungen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. DESNUELLE ET A. CASAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 64.
- ² P. DESNUELLE, M. ROVERY ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 134.
- ³ M. ROVERY, P. DESNUELLE ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 166.
- ⁴ M. BERGMANN ET A. MICKELLEY, *Z. physiol. Chem.*, 140 (1924) 128.
- ⁵ E. M. FRY, *J. Org. Chem.*, 14 (1949) 887.
- ⁶ A. P. PHILLIPS ET R. BALTZLY, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 200.
- ⁷ J. R. REASENBERG ET S. D. GOLDBERG, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 933.
- ⁸ A. C. COPE ET E. M. HANDCOCK, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 1448 et 1738.
- ⁹ G. FODOR ET J. KISS, *Nature*, 164 (1949) 917.
- ¹⁰ S. KANAO, *J. Pharm. Soc. Japan*, 48 (1928) 1070.
- ¹¹ P. DESNUELLE, M. NAUDET ET E. SAMBUC, *Bull. soc. chim. France*, 16 (1949) 650.
- ¹² H. C. REITZ, R. E. FERREL, H. FRAENKEL-CONRAT ET H. S. OLCOTT, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 1024.
- ¹³ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ¹⁴ P. DESNUELLE, M. ROVERY ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 116.
- ¹⁵ H. FRAENKEL-CONRAT ET H. S. OLCOTT, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 259.
- ¹⁶ A. KIESEL ET M. ZNAMENSKAJA, *Z. physiol. Chem.*, 213 (1936) 89.
- ¹⁷ S. M. PARTRIDGE ET H. P. DAVIS, *Nature*, 165 (1950) 62.

Reçu le 30 Janvier 1951