

ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE LA
DISSOCIATION DE LA FONCTION SULPHYDRILE ET STRUCTURE
MOLÉCULAIRE DE LA CYSTÉINE

par

R. H. DE DEKEN, J. BROEKHUYSEN, J. BÉCHET ET A. MORTIER

*Service de Recherches du Centre d'Enseignement et de Recherches des
Industries Alimentaires, C.E.R.I.A., Bruxelles (Belgique)*

INTRODUCTION

L'étude spectrophotométrique d'une solution alcaline d'une protéine possédant des groupes sulfhydryles^{1, 2, 3} nous a conduits à examiner les spectres d'absorption dans l'ultraviolet de la cystéine en milieu alcalin et de nombreuses autres substances ayant un groupe -SH⁴.

Une absorption de lumière due à l'anion sulfhydryle ($R-S^-$) a été mise en évidence et, pour certaines substances, l'existence de liaisons d'hydrogène intramoléculaires intéressant le groupe sulfhydryle est rendue très vraisemblable.

Toutes les précautions ont été prises pour éviter l'oxydation des substances étudiées et la réversibilité des phénomènes observés a été vérifiée.

MATÉRIEL

La L-(—)cystéine, la cystine et la D-L sérine sont des produits de Hoffmann-La Roche. L'acide thioglycolique BDH purissima a été redistillé sous pression réduite. Le thiophénol était un produit BDH également. Le 2 propane-thiol (*isopropyle mercaptan*) a été préparé selon VOGEL⁵. Les acides L-(—)cystéique, β -mercaptopropionique et thiomalique, ainsi que le β -mercaptopropanoïde sont des produits Light. Deux échantillons différents de cystéamine ont été utilisés: l'un a été fourni par Labaz, l'autre synthétisé par condensation d'acide sulfhydrylique sur l'éthylénimine.

MÉTHODES

Les mesures d'absorption ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, modèle DU, avec les cuvettes de quartz de 10 mm d'épaisseur. Pour les mesures de pH, un "Cambridge portable pH meter" a été utilisé. La précision des mesures est de ± 0.01 unité de pH. Pour les mesures spectrophotométriques, les substances étaient mises en solution dans un tampon borate $M/10$. Certains résultats ont été vérifiés en tampon phosphate ou glycocolle ou encore simplement en solution aqueuse portée au pH désiré par addition de soude.

L'absorption était mesurée immédiatement après la dilution afin de réduire au minimum l'erreur par défaut due à l'oxydation de la fonction sulfhydryle. Pour la plupart des substances la vitesse d'oxydation était relativement faible et rendue minimale par l'utilisation d'eau distillée dans un appareil de verre. Pour les substances particulièrement instables, de l'eau distillée une troisième fois sur versène a été utilisée. Parmi les substances étudiées, seule la cystéamine est très instable et, dans ce cas, seuls les maxima d'absorption ont été enregistrés.

La réversibilité des phénomènes mis en évidence a été vérifiée en mesurant le spectre d'absorption d'une solution, de cystéine par exemple, primitivement portée en milieu alcalin pendant un temps court et ramenée ensuite à un pH neutre ou acide.

RÉSULTATS

Les spectres d'absorption de la cystéine pour différentes valeurs du pH sont donnés par la Fig. 1. L'accroissement de densité optique vers 2,350 Å, parallèle à l'augmentation du pH, est effectivement lié à la présence d'un groupe -SH comme le démontrent les spectres d'absorption de trois substances voisines: la cystine, l'acide cystéique et la sérine (Fig. 2).

Le comportement complexe de la cystéine nous a amené à étudier le spectre d'absorption de molécules plus simples.

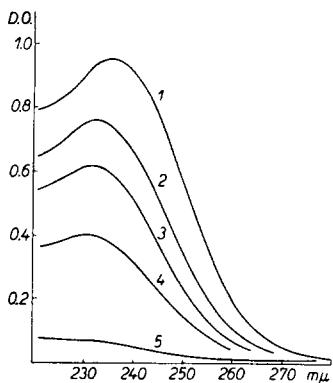


Fig. 1. Spectres d'absorption de la cystéine pour différentes valeurs du pH. Concentration: $2 \cdot 10^{-4} M/l$. Courbe 1: pH 11.70; Courbe 2: pH 10.25; Courbe 3: pH 9.10; Courbe 4: pH 8.32; Courbe 5: pH 6.90.

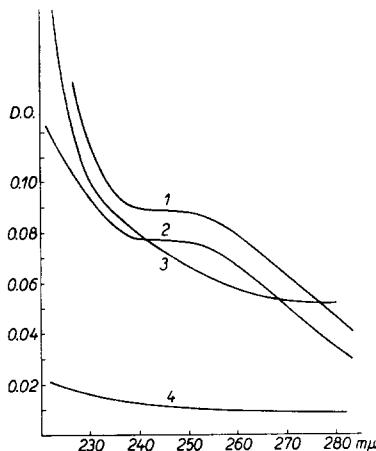


Fig. 2. Spectres d'absorption. Courbe 1: Cystine; pH 11.12; concentration $2 \cdot 10^{-4} M/l$. Courbe 2: Cystine; pH 6.96; concentration $2 \cdot 10^{-4} M/l$. Courbe 3: D-L Sérine; pH 11.85; concentration $10^{-3} M/l$. Courbe 4: Acide cystéique; pH 11.12; concentration $2 \cdot 10^{-4} M/l$.

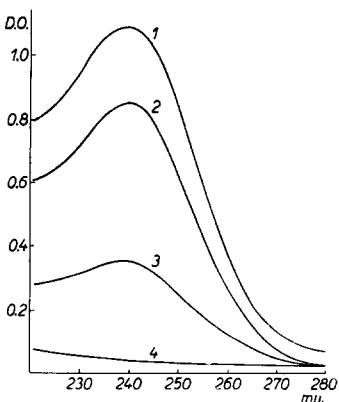


Fig. 3. Spectres d'absorption du 2 propane thiol (isopropyl-mercaptopan) pour différentes valeurs du pH. Concentration: $2 \cdot 10^{-4} M/l$. Courbe 1: pH 12.20; Courbe 2: pH 11.12; Courbe 3: pH 10.20; Courbe 4: pH 9.00.

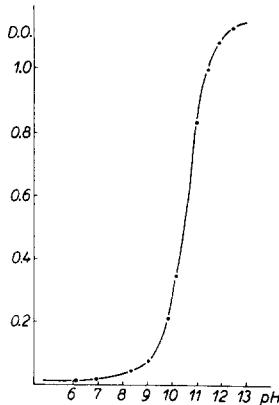


Fig. 4. Variation de la densité optique du 2 propane thiol en fonction du pH à 2.400 Å. Concentration: $2 \cdot 10^{-4} M/l$. pK apparent: 10.6.

Les spectres d'absorption du 2 propane thiol (isopropyle mercaptan) pour différentes valeurs du pH sont donnés par la Fig. 3. Le maximum d'absorption se situe à 2,400 Å et est parfaitement stable. La variation de densité optique à 2,400 Å en

fonction du pH (Fig. 4) donne un pK apparent de 10.6 valeur normale pour le groupe $-SH$. L'absorption est donc due à l'anion $\text{CH}_3-\overset{\text{S}^-}{\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}}$.

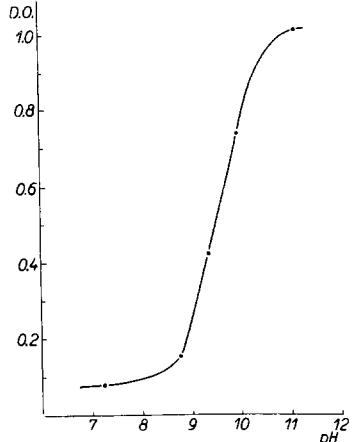


Fig. 5. Variation de la densité optique du β -mercaptopro-éthanol en fonction du pH à 2,350 Å. Concentration: $2 \cdot 10^{-4}$ M/l. pK apparent: 9.6.

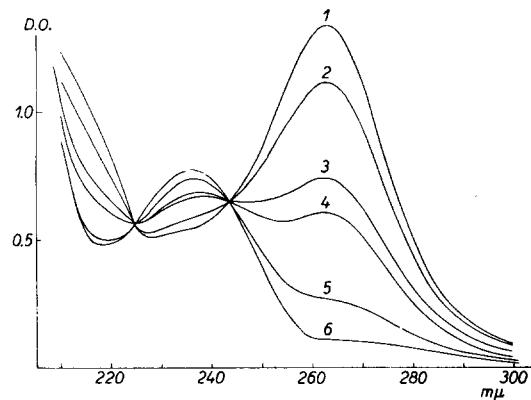


Fig. 6. Spectres d'absorption du thiophénol pour différentes valeurs du pH. Concentration: 10^{-4} M/l; tampon phosphate M/10. Courbe 1: pH 8.24; Courbe 2: pH 7.20; Courbe 3: pH 6.48; Courbe 4: pH 6.28; Courbe 5: pH 5.63; Courbe 6: pH 4.50.

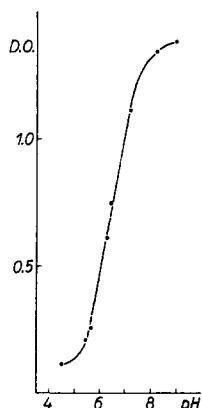


Fig. 7. Variation de la densité optique du thiophénol en fonction du pH à 2,625 Å. pK apparent: 6.5.

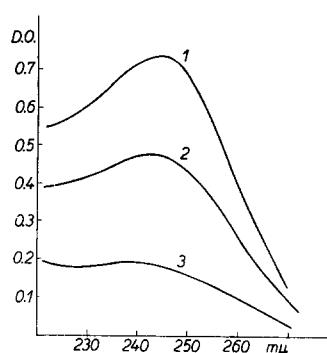


Fig. 8. Spectres d'absorption de l'acide thioglycolique pour différentes valeurs du pH. Concentration: 10^{-4} M/l. Courbe 1: pH 12.25; Courbe 2: pH 10.60; Courbe 3: pH 10.00.

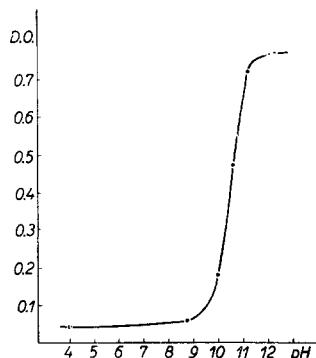


Fig. 9. Variation de la densité optique de l'acide thioglycolique en fonction du pH à 2,400 Å. pK apparent: 10.4.

Le β -mercaptopro-éthanol possède également un maximum d'absorption stable à 2,350 Å en milieu alcalin. La variation de densité optique en fonction du pH (Fig. 5) révèle un pK de 9.6 pour le groupe sulfhydryle.

Le thiophénol offre l'avantage de manifester à la fois une absorption due à l'ion $C_6H_5-S^-$ à 2,625 Å et une absorption due au groupe $-SH$ non dissocié à 2,360 Å (Fig. 6). Les points isobestiques se situent vers 2,250 Å et 2,435 Å. Le pK est de 6.5 (Fig. 7); SCHWARZENBACH⁶ a proposé 7.2 comme pK du thiophénol: cette valeur a été obtenue

par extrapolation, pour une concentration nulle en alcool, de mesures effectuées dans des mélanges eau-alcool.

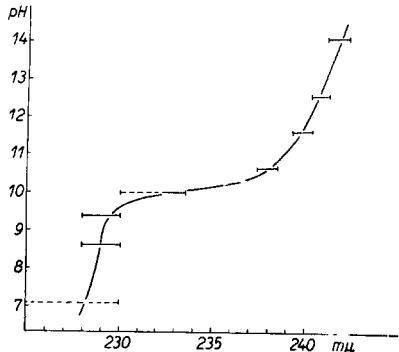
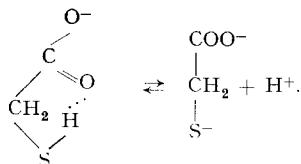


Fig. 10. Variation du maximum d'absorption de l'acide thioglycolique en fonction du pH.

Le comportement de l'acide thioglycolique est plus complexe; le maximum d'absorption se situe vers 2,450 Å (Fig. 8) et le pK apparent est de 10.4 (Fig. 9). Il y a toutefois un déplacement du maximum d'absorption d'environ 120 Å au cours de la dissociation de la fonction sulfhydrique (Fig. 10).

Nous avons formulé une hypothèse selon laquelle ce déplacement du maximum d'absorption serait dû à l'existence d'une liaison d'hydrogène, rompue lors de la dissociation. Cette hypothèse sera rendue plus vraisemblable par l'étude du comportement d'autres substances. La variation d'énergie est de 6.1 kcal/Mole.

La structure proposée ci-dessous pour l'acide thioglycolique tient compte de ce que le groupe C = O est à la fois accepteur d'hydrogène et capteur d'électrons, qui, situé à proximité de la fonction sulfhydrique, rend le proton de cette dernière mobile:



La courbe de variation de densité optique de la cystéine en fonction du pH (Fig. 11) s'étend sur cinq unités de pH (ce qui est anormal pour une dissociation du type acide-base) et révèle l'existence de deux phénomènes successifs dépendant apparemment de deux dissociations différentes. Le premier, qui se manifeste entre pH 7 et 9 est simultané à la dissociation de la fonction amine ($-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$) et le pK spectrophotométrique du phénomène (8.10) est en bon accord avec le pK du groupe amine: 8.18⁷. Le second accroissement de densité optique (pH 9.5 à 11.5) coïncide avec la dissociation du groupe sulfhydrique, et les pK spectrophotométrique et titrimétrique sont respectivement de 10.4 et 10.28⁷.

Le problème peut être élucidé en procédant par comparaison avec le comportement spectrophotométrique de substances à structure voisine de celle de la cystéine. La suppression de la fonction sulfhydrique, soit par substitution par un atome d'hydrogène (alanine), soit par une fonction hydroxyle (sérine), entraîne la disparition de toute augmentation de densité optique en milieu alcalin. Il en est de même en oxydant le groupe $-\text{SH}$ en une liaison disulfure (cystine) ou en une fonction sulfonique (acide cystéique) (Fig. 2). *Il est donc certain que les deux phénomènes de dissociation successifs dépendent de la fonction sulfhydrique.*

La substitution de la fonction amine par un atome d'hydrogène (acid β -mercaptopropionique) supprime la variation de densité optique enregistrée pour la cystéine

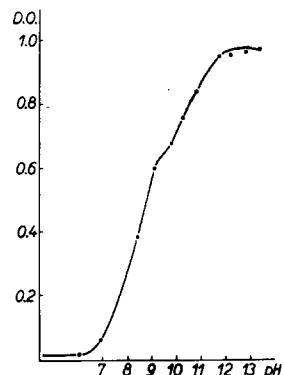


Fig. 11. Variation de la densité optique de la cystéine en fonction du pH à 2,350 Å. Concentration: $2 \cdot 10^{-4} \text{ M/l.}$

entre pH 7 et 9. L'augmentation de densité optique manifestée par l'acide β -mercaptopropionique en milieu alcalin correspond uniquement à la dissociation du groupe sulfhydryle (Fig. 12). La première variation de densité optique manifestée par la cystéine entre pH 7 et 9 résulte donc d'une action de la fonction amine sur le groupe sulfhydryle.

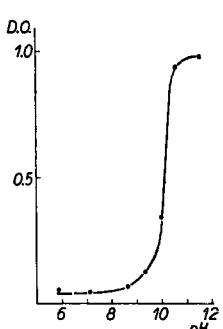


Fig. 12. Variation de la densité optique de l'acide β -mercaptopropionique en fonction du pH à 2.370 A. Concentration: $2 \cdot 10^{-4}$ M/l. pK apparent: 10.2.

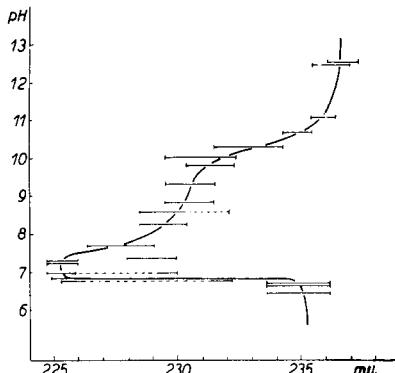
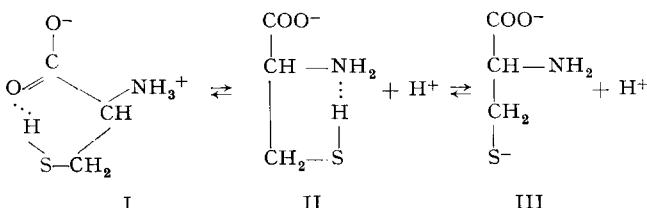


Fig. 13. Variation du maximum d'absorption de la cystéine en fonction du pH.

La Fig. 13 donne le déplacement du maximum d'absorption de la cystéine en fonction du pH; il se fait en deux stades et les variations d'énergie correspondant à chacun de ces déplacements sont 2.7 et 3.1 Kcal/Mole, soit 5.8 kcal/Mole au total. En dessous de pH 7, il n'y a plus de maximum vrai.

Les formes moléculaires que nous proposons pour la cystéine sont:



En milieu acide la structure I, semblable à celle proposée pour l'acide thioglycolique prévaudrait. Après neutralisation de la fonction amine (structure II), le pont d'hydrogène s'établirait avec l'atome d'azote; l'ionisation de la fonction sulfhydryle déterminerait, enfin, la rupture de la liaison d'hydrogène (III)*.

La structure I tient compte de ce que la molécule possède un accepteur d'hydrogène ($\text{C} = \text{O}$) et un très bon capteur d'électrons (NH_3^+) rendant l'atome d'hydrogène du groupe SH particulièrement mobile**. La structure II ne possède plus ce capteur

* La possibilité stérique des structures moléculaires proposées a été vérifiée à l'aide de modèles moléculaires.

** Il n'est pas possible de démontrer expérimentalement l'importance d'une β induction d'un groupe NH_3^+ sur le pK de la fonction sulfhydryle, puisque la fonction amine est déjà neutralisée (NH_2) lorsque le pH est suffisamment élevé pour provoquer la dissociation du groupe-SH. D'autre part, nous ne connaissons pas les pK des mercaptans β -halogénés, substances qui pourraient témoigner de la sensibilité du groupe SH à une β induction. Mais, comparées à l'acide propionique (pK 4.874), l' α et la β -alanine (pK respectivement de 2.348 et 3.60) montrent l'importance quantitative de l'induction exercée par NH_3^+ sur $-\text{OH}^{\ddagger}$. Pour référence, voici les pK des acides α et β -bromopropionique: respectivement 2.967 et 4.009.

d'électrons, mais l'atome d'azote de la fonction NH_2 est, au contraire, devenu un très bon accepteur d'hydrogène.

Un pont d'hydrogène du type $-\text{S}-\text{H} \cdots \text{N}-$ a été proposé par R. E. ET R. BENESCH dans le but d'expliquer la faible réactivité du groupe $-\text{SH}$ de substances telles que: acide thioglycolique, cystéine et glutathion⁹.

Le comportement de deux dérivés de la cystéine aide à la compréhension des phénomènes. L'acide β -mercaptopropionique, dérivant de la cystéine par désamination, possède un maximum d'absorption stable vers 2,370 Å (Fig. 12). A première vue, on peut se demander pourquoi le groupe $-\text{SH}$ n'établit pas de liaison d'hydrogène avec le groupe carbonyle, comme dans le cas de la structure I attribuée à la cystéine. En fait, la disparition du groupe NH_3^+ , capteur d'électrons, a fortement diminué la mobilité du proton de la fonction sulfhydryle. De plus, le groupe $\text{C} = \text{O}$, plus distant de la fonction SH que dans le cas de l'acide thioglycolique, ne peut plus guère influencer le proton par induction.

La cystéamine, dérivant de la cystéine par décarboxylation, présente un déplacement du maximum d'absorption en milieu alcalin (Fig. 14). Le groupe NH_2 , très bon accepteur d'hydrogène, peut établir, avec un groupe $-\text{SH}$ non activé une liaison d'hydrogène, comme dans le cas de la structure II de la cystéine.

L'acide thiomalique dont la structure rappelle à la fois celle de l'acide thioglycolique et celle de l'acide β -mercaptopropionique, manifeste également un déplacement du maximum d'absorption (Fig. 15).

Le glutathion (Fig. 16) a un comportement spectrophotométrique semblable à celui de la cystéine; le maximum d'absorption de l'anion sulfhydryle est toutefois difficile à préciser. La densité optique augmente régulièrement en fonction du pH et la variation s'étend sur un peu plus de quatre unités de pH (Fig. 17). La courbe est toutefois continue et nous supposons que cette continuité est due au rapprochement des pK des fonctions amine et sulfhydryle: la fonction amine du glutathion a effectivement un pK de 8.66⁷ au lieu de 8.18 pour la cystéine; le groupe sulfhydryle possède certainement un pK inférieur à celui du groupe $-\text{SH}$ de la cystéine: une valeur aussi basse que 9.12 a été mesurée⁷.

Le groupe sulfhydryle du glutathion est donc également engagé dans une liaison d'hydrogène, sans doute avec la fonction amine du résidu glutamyle.

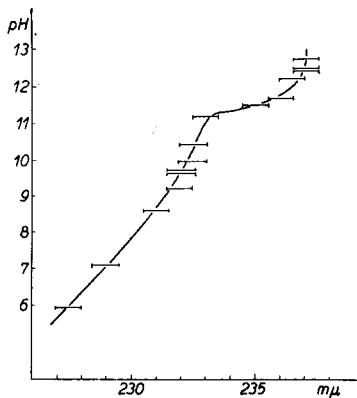


Fig. 14. Variation du maximum d'absorption de la cystéamine en fonction du pH.

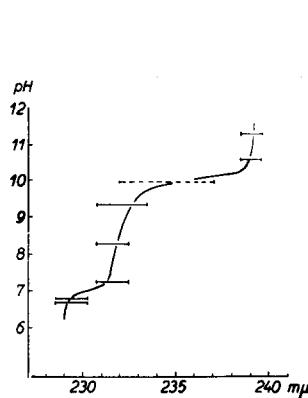


Fig. 15. Variation du maximum d'absorption de l'acide thiomalique en fonction du pH.

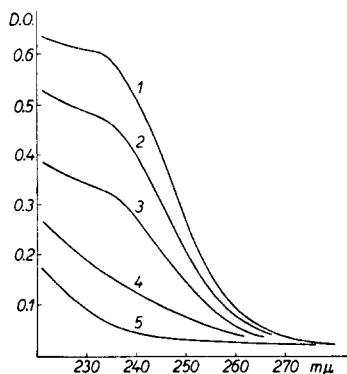


Fig. 16. Spectres d'absorption du glutathion pour différentes valeurs du pH. Concentration: 10^{-4} M/l. Courbe 1: pH 11.12; Courbe 2: pH 9.80; Courbe 3: pH 9.00; Courbe 4: pH 8.35; Courbe 5: pH 6.96.

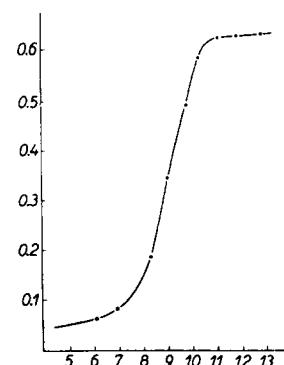


Fig. 17. Variation de la densité optique du glutathion en fonction du pH à 2,300 Å. Concentration: 10^{-4} M/l.

L'interprétation générale des phénomènes observés est la suivante: l'atome d'hydrogène de la fonction sulfhydryle peut être engagé dans une liaison d'hydrogène intramoléculaire si la première et l'une des deux autres conditions suivantes sont remplies:

- (1) Possibilité stérique
- (2) Présence d'un groupe accepteur d'hydrogène énergique tel que $-\text{NH}_2$
- (3) Présence simultanée d'un accepteur d'hydrogène ($\text{C} = \text{O}$, NH_2) et d'un capteur d'électrons ($\text{C} = \text{O}$ à courte distance du groupe $-\text{SH}$ et $-\text{NH}_3^+$ à distance plus grande).

DISCUSSION DES RÉSULTATS

On ne peut pas affirmer formellement que les déplacements de maxima d'absorption observés sont dus à l'existence de liaisons d'hydrogène. Il y a néanmoins déplacement du maximum d'absorption chaque fois que la structure de la molécule permet de prévoir l'existence d'une liaison d'hydrogène. Inversément, le maximum d'absorption est stable lorsque la structure moléculaire ne permet pas de prévoir une liaison d'hydrogène. De plus, il est logique de penser que la forme moléculaire avec pont d'hydrogène manifeste une absorption dans une région de l'ultra violet proche de la zone d'absorption de l'anion sulfhydryle, la liaison S-H de l'ensemble $\text{S}-\text{H}\cdots\text{X}$ devant être fortement ionique.

Les faits révélés par ce travail constituent donc un argument de poids en faveur de l'idée suivant laquelle la fonction sulfhydryle peut être engagée dans une liaison d'hydrogène.

Le travail est poursuivi sur les protéines.

Note. Les seules données que nous ayons pu recueillir à propos d'absorption de lumière par l'anion sulfhydryle sont réunies ci-dessous.

Dans un article général de BEAVEN ET HOLIDAY¹⁰ le spectre de la cystéine en milieu acide est emprunté aux travaux de ANSLOW ET FOSTER¹¹ et FROMAGEOT ET SCHNEK¹². Les auteurs mentionnent également que l'absorption de l'anion sulfhydryle n'est pas connue avec certitude.

BRODE signale l'existence d'une absorption à 227 m μ pour le groupe-SH¹³.

Enfin dans l'infra-rouge le groupe-SH absorbe entre 3.85 et 4.08 μ ¹⁴.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance à Monsieur le Professeur J. M. WIAME ainsi qu'à L. LEDOUX pour la contribution qu'ils ont apportée à ce travail au cours de discussions. L'un d'entre nous (R.H.D.) remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur TH. BÜCHER qui lui a donné l'occasion d'apprendre à connaître les conditions optimales de stabilité des fonctions sulphydriques de protéines. Nous remercions Monsieur le Professeur BACQ de nous avoir procuré de la cystéamine.

Ce travail a été subsidié par le "Comité pour l'étude des froments indigènes et de leur utilisation" et par "l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture" (IRSIA).

RÉSUMÉ

Une absorption de lumière aux environs de 2,400 Å a été mise en évidence pour l'anion sulphydrylique.

Pour certaines substances, la dissociation du groupe -SH est accompagnée d'un déplacement du maximum d'absorption; dans le cas de la cystéine, il y a une "dissociation prématuée" de la fonction sulphydrylique.

L'étude comparative de nombreuses substances portant le groupe -SH a permis de rattacher les anomalies du comportement spectrophotométrique de ces substances à l'existence de ponts d'hydrogène entre le groupe -SH et le groupe carbonyle ($C=O$) ou la fonction amine (NH_2).

SUMMARY

It is demonstrated that the sulphydryl anion absorbs light at about 2,400 Å.

For some substances, the dissociation of the -SH group is accompanied by a displacement of the absorption maximum; in the case of cysteine, there is a kind of "predissociation" of the sulphydryl function.

The comparative study of several substances possessing an -SH group shows the connection between the abnormal spectrophotometric behaviour of these substances and the existence of hydrogen bonds between the -SH group and a carbonyl group ($C=O$) or an amine group (NH_2).

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Lichtabsorption um 2,400 Å wurde für das Sulphydrylanion nachgewiesen.

Für gewisse Substanzen ist die Dissoziation der -SH Gruppe von einer Verschiebung des Absorptionsmaximum begleitet; im Falle der Cystein gibt es eine "frühzeitige Dissoziation" der Sulphydryl Funktion.

Der vergleichende Untersuchung zahlreicher -SH tragender Substanzen hat dazu geführt, die Störungen der Spektrophotometrischen Verhaltens gewisser dieser Substanzen mit dem Bestehen von Wasserstoffbrücken zwischen der -SH Gruppe und der Carbonylgruppe ($C=O$) oder der Aminogruppe (NH_2) zu verbinden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. H. DE DEKEN, A. MORTIER ET J. M. WIAME, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 488.
- ² R. H. DE DEKEN ET A. MORTIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 354.
- ³ R. H. DE DEKEN ET M. DE DEKEN-GRENSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 566.
- ⁴ R. H. DE DEKEN, J. BÉCHET, J. BROECKHUYSEN ET A. MORTIER, *Arch. Intern. Physiol.*, 62 (1954) 290.
- ⁵ A. I. VOGEL, *Practical Organic Chemistry*, Longmans, Green and Co., New York, 1951, p. 481.
- ⁶ G. SCHWARZENBACH AND A. EPPRECHT, *Helv. Chim. Acta*, 19 (1936) 493.
- ⁷ E. J. COHN AND J. T. EDSSL, *Proteins, Amino acids and Peptides*, Reinhold Pub. Corp., New York, 1943, p. 85.
- ⁸ E. J. COHN AND J. T. EDSSL, *ibid.*, Chapter V.
- ⁹ R. E. BENESCH AND R. BENESCH, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4, 367.
- ¹⁰ G. H. BEAVEN AND E. R. HOLIDAY, *Advances in Protein Chem.*, 7 (1952) 319.
- ¹¹ G. A. ANSLOW AND M. L. FOSTER, *J. Biol. Chem.*, 97 (1932) 37.
- ¹² C. FROMAGEOT ET G. SCHNEK, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 113.
- ¹³ W. R. BRODE, *Chemical Spectroscopy*, New York, 1947, p. 217.
- ¹⁴ M. G. MELLON, *Analytical Absorption Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New York, 1950.

Reçu le 2 juin 1955