

## 137. Sur les phospho-peptones de la caséine (lactotyrines)<sup>1)</sup>

par Théodore Posternak et Hans Pollaczek.

(15. IX. 41.)

### *Introduction.*

On sait depuis longtemps que si l'on soumet les phospho-protéides (caséine, vitelline, ichtuline) à l'action des fermentes protéolytiques, on peut obtenir des produits de dégradation plus riches en phosphore que les protides de départ.

Pour citer des travaux anciens concernant la caséine, rappelons que *Salkowski*<sup>2)</sup> ayant traité le protide par la pepsine chlorhydrique isola sous forme de sel de fer un produit assez riche en phosphore (4%) et qui donnait encore toutes les réactions des matières albuminoïdes. Plus tard *Reh*<sup>3)</sup> isola, toujours des produits de digestion peptique et sous forme de sels d'urane, des substances analogues. A l'hydrolyse ces produits fournitrent un très grand nombre d'acides aminés.

En 1927, *S. Posternak*<sup>4)</sup>, ayant soumis la caséine à l'action de la trypsine, put en retirer une série de substances phosphorées de compositions voisines auxquelles il donna le nom de *lactotyrines*. Leurs rapports atomiques N/P variaient de 3,75 à 4,25. A l'hydrolyse acide, les lactotyrines fournirent à côté d'acide phosphorique les produits suivants: acide glutamique, acide aspartique, sérine, isoleucine, ammoniaque et acide pyruvique. Parmi ces produits de clivage, on ne trouve qu'un acide oxyaminé: la sérine. Il devenait alors très probable que c'est aux hydroxyles des séries que se trouvent fixés les groupes phosphoryles, d'autant plus que ces lactotyrines présentent des réactions communes avec d'autres tyries obtenues à partir de la vitelline du jaune d'œuf<sup>5)</sup> et dans lesquelles la présence de restes de phospho-séries était bien établie (formation d'ammoniaque et d'acide pyruvique sous l'action des alcalis).

A la même époque, *C. Rimington*<sup>6)</sup> ayant soumis également la caséine à une digestion tryptique isola des substances phosphorées qu'il nomma *phospho-peptones*. Le produit le plus riche en phosphore obtenu par cet auteur avait un rapport atomique N/P = 3. *Rimington* le considère comme formé de 9 acides aminés et de 3 acides phosphoriques. Comme produits de clivage il indiqua, à côté de l'acide phosphorique, les acides aminés suivants: acide oxy-glutamique (3 mol.), sérine (2 mol.), acide amino-oxy-butyrique (4 mol.). Ajoutons d'ailleurs que le dernier acide, qui est différent de la thréonine<sup>7)</sup>, n'a jamais été retrouvé depuis dans la caséine. *Rimington* admit tout à fait arbitrairement que dans sa phospho-peptone l'acide phosphorique se trouve lié à l'acide oxy-glutamique; dans son mémoire, cet auteur publia une formule développée, dans laquelle tous les détails de constitution de la phospho-peptone se trouvent indiqués, formule qui représente un exemple caractéristique de « Papierchemie ».

Les résultats de *Rimington* ont été contestés un peu plus tard par *S. Posternak*<sup>8)</sup>; cet auteur, ayant soumis la caséine à une digestion tryptique dans des conditions ana-

<sup>1)</sup> Communication préliminaire: C. r. Soc. phys. et Hist. nat. Genève, **54**, 236 (1940).

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **32**, 245 (1901).

<sup>3)</sup> Hofmeister's Beiträge, **11**, 1 (1907); voir aussi Dietrich, Bioch. Z. **22**, 120 (1909).

<sup>4)</sup> C. r. **184**, 306 (1927).

<sup>5)</sup> C. r. **185**, 615 (1927); **187**, 313 (1928).

<sup>6)</sup> Biochem. J. **21**, 1179 et 1187 (1927).

<sup>7)</sup> McCoy, Meyer et Rose, J. Biol. Chem. **112**, 283 (1935).

<sup>8)</sup> C. r. **186**, 1762 (1928).

logues à celles qu'employait *Rimington*, obtint une tyrine de rapport atomique N/P = 3,5. Il y admettait la présence de 4 acides phosphoriques et de 14 acides aminés. La composition de cette tyrine restant à peu près constante si l'on prolonge l'action du ferment, *S. Posternak* l'a considérée comme un produit-limite de dégradation. A l'hydrolyse, il obtint les mêmes acides aminés qu'à partir des autres lactotyrines, soit de l'acide glutamique, de la sérine, de l'iso-leucine et de l'acide aspartique.

En 1933, *Levene et Hill*<sup>1)</sup> soumirent à une hydrolyse acide ménagée une phosphopeptone de caséine préparée d'après la méthode de *S. Posternak*. Ils purent en isoler, sous forme d'un sel de brucine cristallisé, un dipeptide formé d'acide sérine-phosphorique et d'acide glutamique qui représente, comme nous l'avons montré dans une communication précédente<sup>2)</sup>, l'acide phosphoséryl-glutamique. Peu de temps auparavant, *F. Lipmann*<sup>3)</sup> avait obtenu de l'acide sérine-phosphorique par hydrolyse acide directe de la caséine.

A la même époque, *G. Schmidt*<sup>4)</sup>, ayant soumis la caséine à une très longue digestion tryptique (un mois) en présence d'une grande quantité de pancréatine, obtint un produit qu'il considère comme identique à l'acide dipeptide-phosphorique de *Levene et Hill*. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce travail.

Pour terminer cette revue, citons enfin une note de caractère préliminaire parvenue à notre connaissance après l'achèvement de nos propres recherches. *Damodaran et Ramachandran*<sup>5)</sup> indiquent avoir obtenu par digestions d'abord peptique, puis tryptique de la caséine une phospho-peptone de rapport atomique N/P = 3,3—3,4, contenant 10 acides aminés et 3 acides phosphoriques. A l'hydrolyse, les auteurs hindous obtinrent de la sérine, de l'acide glutamique et de l'iso-leucine; rappelons que *S. Posternak* avait déjà signalé les mêmes acides aminés dans ses lactotyrines.

En résumé, on peut dire que presque tous les travaux ultérieurs ont confirmé la conception de *S. Posternak*, d'après laquelle dans la caséine, comme dans les autres phospho-protéides étudiés, l'acide phosphorique est fixé à des restes de sérine. La question du mode de liaison du phosphore étant éclaircie, on pouvait se demander alors quels sont la nature et l'ordre de liaison des acides aminés se trouvant dans le voisinage des phospho-séries. L'isolement de l'acide dipeptide-phosphorique de *Levene et Hill* montrait déjà qu'une partie tout au moins de la phospho-sérine se trouve combinée à l'acide glutamique. Pour avoir des renseignements plus étendus, il était alors logique de s'adresser aux lactotyrines (phospho-peptides) et le présent travail a été entrepris dans le but de préciser la constitution de ces substances et aussi d'expliquer la résistance qu'elles opposent à l'action des ferments protéolytiques.

Pour désigner les produits phospho-organiques obtenus par dégradation enzymatique de la caséine, nous emploierons le terme de *phospho-peptone*. En vérité, les produits dont il est question sont préparés par des digestions tryptiques et non peptiques et le terme de *phospho-tryptone* eût été plus logique; mais la plupart des auteurs

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **101**, 711 (1933).

<sup>2)</sup> Helv. **24**, 921 (1941).

<sup>3)</sup> Bioch. Z. **262**, 3 et 9 (1933).

<sup>4)</sup> Z. physiol. Ch. **223**, 86 (1934); Naturwiss. **21**, 202 (1933).

<sup>5)</sup> Nature, **145**, 857 (1940).

ayant adopté le nom de phospho-peptone, nous l'emploierons également pour éviter de compliquer la nomenclature.

### *Préparation et composition des phospho-peptones.*

Nous avons étudié deux espèces de phospho-peptones que nous désignerons comme *phospho-peptones I* et *phospho-peptones II*.

Les *phospho-peptones I* ont été préparées par une digestion tryptique de relativement courte durée (2—5 jours). Comme l'avaient déjà montré des recherches antérieures, il se forme ainsi une substance de rapport at. N/P ~ 3,5 dont la composition ne se modifie plus que très lentement par l'action ultérieure du ferment<sup>1)</sup>. Le rapport at. N/P de nos propres préparations variait de 3,4 à 3,6; l'azote aminé, dosé d'après *van Slyke*, constituait 9,2—9,6 % de l'azote total. Si nous nous représentons la substance comme formée d'une chaîne ne contenant que des liaisons peptidiques entre acides mono-aminés, ces chiffres indiquent que la phospho-peptone I contient 10—11 acides aminés et 3 restes phosphoryles. Ajoutons que la substance se laisse dégrader beaucoup plus rapidement par les enzymes pancréatiques après déphosphorylation par la phosphatase des reins.

D'autre part, notre attention a été attirée sur le produit préparé par *G. Schmidt*<sup>2)</sup>. Rappelons que cet auteur soumit la caséine à une digestion pancréatique de 4 semaines en présence d'une grande quantité de ferment. Le produit le plus riche en phosphore qu'il obtint avait un rapport at. N/P = 2,0. Il le considère comme identique à l'acide dipeptide-phosphorique de *Levene* et *Hill* (acide phosphoséryl-glutamique). Disons immédiatement qu'à priori il était très peu probable que la substance de *Schmidt* représentât un phospho-dipeptide; en effet, d'après les indications de l'auteur lui-même, le produit donne une forte réaction rouge-violet du biuret, alors que la réaction de l'acide dipeptide-phosphorique est négative, comme nous avons pu le constater.

Opérant dans les conditions indiquées par *Schmidt*, nous avons obtenu, en partant de la caséine, un composé de rapport atomique N/P = 2,7 et dont l'azote aminé représente 12,1 % de l'azote total: ces chiffres correspondent à une chaîne de 8 acides mono-aminés estérifiée par 3 acides phosphoriques. En partant d'une phospho-peptone, par contre, que nous avons soumise à une longue digestion pancréatique, nous avons obtenu une substance de rapport at. N/P = 2,37; ce rapport, sans atteindre la valeur de 2,0 indiquée par *Schmidt*, en est toutefois assez rapproché. L'azote aminé dosé d'après *van Slyke* représente 14,4 % de l'azote total. Nous avons donc affaire ici à un heptapeptide estérifié par 3 acides phosphoriques.

<sup>1)</sup> *S. Posternak*, C. r. **186**, 1762 (1928).

<sup>2)</sup> *Z. physiol. Ch.* **223**, 86 (1934).

Ajoutons que ces teneurs en azote aminé sont incompatibles avec la représentation de *Schmidt* qui croit avoir obtenu un dipeptide: si tel était le cas, la teneur en azote aminé devrait évidemment atteindre 50 % de l'azote total<sup>1)</sup>.

Nous désignerons sous le nom de phospho-peptones II les produits obtenus d'après *Schmidt* par des digestions prolongées en présence de grandes quantités de ferment.

### *Produits d'hydrolyse.*

Les phospho-peptones ne donnent ni la réaction de *Millon*, ni la réaction xanthoprotéique, ni celle de *Hopkins-Cole*, ni celle de *Molisch*. Elles ne contiennent pas de bases hexoniques. Par hydrolyse acide, il se forme (à côté d'acide phosphorique) de l'ammoniaque, de l'acide pyruvique et des acides mono-aminés. L'ammoniaque et l'acide pyruvique résultent de l'altération de la sérine. Comme l'avaient déjà montré des recherches antérieures<sup>2)</sup>, la phospho-peptone I fournit à l'hydrolyse les acides aminés suivants: *l*(-)-sérine, *l*(+)-isoleucine, acide *l*(+)-glutamique, acide *l*(-)-aspartique. La phospho-peptone II contient, comme nous l'avons constaté, les mêmes acides aminés, à l'exception de l'acide aspartique.

Des dosages de sérine ont été effectués dans les hydrolysats des phospho-peptones au moyen de la méthode colorimétrique de *Eegriwe-Rapoport*<sup>3)</sup>. Pour le calcul des résultats, il est nécessaire de tenir compte des faits suivants:

Lorsqu'on traite les phospho-peptones par les acides minéraux bouillants (30 heures d'ébullition en présence d'acide chlorhydrique à 18%), il se forme une certaine quantité d'ammoniaque (12% environ de l'azote total). Ceci n'est pas dû à la présence de groupes amides dans les substances: en effet cette ammoniaque n'apparaît que lentement et sa quantité augmente avec la durée de chauffe et la concentration de l'acide. Les amides véritables, par contre (glutamine, asparagine), sont hydrolysées complètement dans des conditions beaucoup plus douces<sup>4)</sup>. D'autre part, la formation d'ammoniaque s'accompagne toujours de celle d'acide pyruvique; or on sait que ces deux substances résultent de la décomposition de la sérine. Nous avons donc expliqué la formation d'ammoniaque par cette destruction de sérine<sup>5)</sup>, d'autant plus que, de tous les acides aminés contenus dans les phospho-peptones, c'est la sérine seule qui s'altère sous l'action des acides. Il est alors nécessaire, pour établir la teneur réelle de la substance primitive, d'ajouter à la sérine décelée dans l'hydrolysat une quantité correspondant à l'ammoniaque formée. C'est par suite d'omission de cette correction que les dosages de sérine effectués par *Rapoport* dans des produits d'hydrolyse de phospho-protéides sont certainement erronés<sup>6)</sup>.

D'autre part, nous avons dosé dans l'hydrolysat des phospho-peptones l'azote oxy-aminé total par la méthode au periodate de

<sup>1)</sup> Il semble d'ailleurs que *Schmidt* n'ait pas dosé l'azote aminé de ses produits.

<sup>2)</sup> *S. Posternak*, C. r. **186**, 1762 (1928).

<sup>3)</sup> *Bioch. Z.* **289**, 406 (1937).

<sup>4)</sup> Voir p. ex.: *Osborne et Nollan*, *J. Biol. Chem.* **43**, 311 (1920).

<sup>5)</sup> *S. et Th. Posternak*, C. r. **185**, 615 (1927); **187**, 313 (1928).

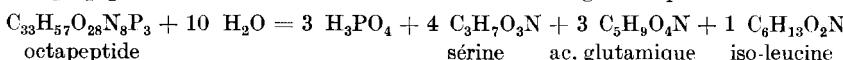
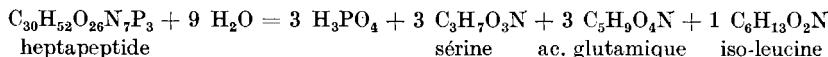
<sup>6)</sup> *Bioch. Z.* **289**, 420 (1937).

van Slyke<sup>1</sup>): cet azote correspond à l'ammoniaque totale présente dans l'hydrolysat après traitement par le periodate alcalin. Les chiffres obtenus concordent approximativement avec ceux qu'a fournis le dosage corrigé d'après Eegrive-Rapoport: ceci confirme l'absence dans nos produits d'autre acide oxyaminé que la sérine. Sous l'action du periodate, il se forme, d'autre part, de l'aldéhyde formique qui a été identifié par sa combinaison dimédonique.

	Rapport at. N/P	Nombre total d'ac. aminés	Nombre total de mol. de sérine	Nombre tota de mol. d'ac. oxyaminés
Phospho-peptone I	3,65	11	4,8	4,6
Phospho-peptone II	2,69	8	3,9	—
Phospho-peptone II	2,37	7	3,0	3,3

Comme le montre le tableau ci-dessus, nous avons trouvé dans une phospho-peptone II de  $N/P = 2,37$  (heptapeptide) 3 molécules de sérine, soit la quantité correspondant aux 3 molécules d'acide phosphorique. Dans la phospho-peptone II de  $N/P = 2,69$  (octapeptide) nous trouvons environ 4 molécules de sérine.

D'après les quantités d'amino-acides dosées ou effectivement isolées, nous pensons que l'hydrolyse des phospho-peptides II peut s'exprimer de la manière suivante:



### *Acide aminé portant le groupe aminé terminal.*

Pour établir la nature de l'acide aminé auquel appartient le groupe aminé terminal de la chaîne, nous avons traité nos substances par l'acide nitreux. Les produits désaminés ont été isolés et hydrolysés par l'acide minéral. Les hydrolysats obtenus aussi bien à partir des phospho-peptides I que des phospho-peptides II donnent la réaction de l'acide glycérique après traitement par le réactif à la naphto-résorcine de *Eegriwe-Rapoport*<sup>2</sup>). Nous nous sommes assurés qu'à l'exception de la sérine aucun acide aminé contenu dans les phospho-peptides ne donne après désamination de réaction semblable, ce qui était d'ailleurs à prévoir d'après les indications d'*Eegriwe* concernant la spécificité de cette réaction. Il en résulte donc que le groupe aminé libre des phospho-peptides appartient à un reste de sérine. Ce reste est forcément estérifié par l'acide phosphorique dans la phosphopeptide II (heptapeptide) qui ne contient que 3 séries, soit la quan-

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. 133, 288 (1940).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **289**, 406 (1937).

tité correspondant aux 3 acides phosphoriques. Les observations suivantes indiquent qu'il en est de même dans la phospho-peptone I:

On sait que sous l'action des periodates alcalins la sérine est scindée rapidement avec formation d'aldéhyde formique et d'ammoniaque<sup>1)</sup>. Cette réaction nécessitant la présence d'un groupement  $\text{HOCH}_2-\text{CHNH}_2-$  libre n'est pas donnée par les dérivés acylés de la sérine. Nous avons constaté en effet que l'acide sérine-phosphorique n'est pas attaqué par le periodate<sup>2)</sup>. Or, il en est de même de la phospho-peptone I. Par contre, après déphosphorylation par une phosphatase des reins de porc<sup>3)</sup> ne contenant pas de quantité notable de peptidase, la phospho-peptone est attaquée par le periodate avec formation d'ammoniaque et d'aldéhyde formique. Ces faits s'expliquent aisément par la présence d'un reste de phospho-sérine à l'extrémité de la chaîne de la phospho-peptone.

#### *Déphosphorylation par la phosphatase des reins de porc et par l'acide.*

Nous avons étudié comparativement les déphosphorylations enzymatiques des substances suivantes:

Phospho-peptone I (N/P = 3,56)

Phospho-peptone II (N/P = 2,37)

Acide dipeptide-phosphorique (acide phosphoséryl-glutamique)

Acide sérine-phosphorique<sup>4)</sup>.

Nous avons soumis ces produits dans des conditions identiques (mêmes concentrations en phosphore et en ferment) à l'action de la phosphatase des reins de porc. Comme le montrent les courbes de la fig. 1, les produits de poids moléculaires les moins élevés sont ceux

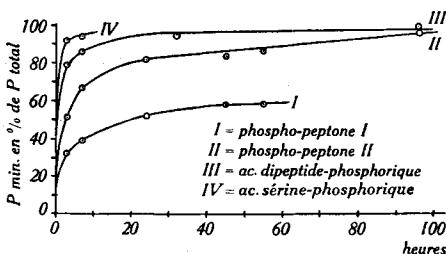


Fig. 1.

qui perdent le plus facilement leur phosphore. C'est ainsi que l'acide sérine-phosphorique et l'acide dipeptide-phosphorique sont déphosphorylés rapidement et complètement. Les phospho-peptides I et II

<sup>1)</sup> *Nicole et Shinn*, Am. Soc. **61**, 1615 (1939); *van Slyke et coll.*, J. Biol. Chem. **43**, 311 (1920).

<sup>2)</sup> D'autre part, nous avons constaté que des dérivés N-acylés de la sérine tels que les dérivés benzoylé et naphtalène- $\beta$ -sulfonylé résistent également au périodate, dans les conditions de nos expériences.

<sup>3)</sup> *A. et E. Albers*, Z. physiol. Ch. **232**, 193 (1935).

<sup>4)</sup> *Lipmann et Levene*, J. Biol. Chem. **98**, 109 (1932).

sont déphosphorylées plus lentement, mais alors que la phosphopeptone II perd finalement la presque totalité de son phosphore, l'autre phospho-peptone n'en perd que 60 %, soit un peu moins de 2 atomes P sur 3; le phosphore restant est beaucoup plus difficilement minéralisable.

On sait qu'un des caractères des phospho-protéides est la facilité avec laquelle ils sont déphosphorylés par les alcalis. Pour cette raison, il était intéressant de comparer les vitesses de déphosphorylation alcaline des quatre mêmes substances. Nous avons constaté que les vitesses de déphosphorylation sous l'action de la soude à 1% à 37° sont en ordre inverse des vitesses de déphosphorylation enzymatique. Cette fois, ce sont les deux phospho-peptides, c'est-à-dire les produits de poids moléculaire les plus élevés, qui perdent facilement leur phosphore, alors que l'acide dipeptide-phosphorique et, davantage encore, l'acide sérine-phosphorique, se montrent résistants.

#### *Action de l'amino-peptidase.*

Lorsqu'on soumet les phospho-peptides à l'action de l'amino-peptidase de la muqueuse intestinale du porc, les substances ne sont dégradées que très lentement, comme l'indiquent les dosages d'après *van Slyke* de l'augmentation de l'azote aminé. Cette dégradation lente est accompagnée d'une minéralisation lente du phosphore, due à la présence d'un peu de phosphatase intestinale dans notre préparation d'amino-peptidase: nous pensons que c'est cette déphosphorylation préalable qui permet l'hydrolyse par la peptidase. En effet, si l'on ajoute au mélange substrat-ferment de la phosphatase des reins de porc dépourvue de peptidase, on constate que la déphosphorylation beaucoup plus rapide qui se produit permet une dégradation beaucoup plus rapide également par la peptidase.

Dans certaines expériences, nous avons soumis la phosphopeptone I (N/P ~ 3,5) à l'action simultanée d'une petite quantité de phosphatase des reins et de l'amino-peptidase. Dans d'autres expériences nous avons soumis le produit d'abord à l'action de la phosphatase des reins, puis, après destruction de l'enzyme par la chaleur, à celle de l'aminopeptidase jusqu'à ralentissement considérable de l'augmentation de l'azote aminé.

Si l'on porte en ordonnées le rapport atomique

$$\frac{\Delta \text{NH}_2-\text{N}}{\text{PM}} \quad (\Delta \text{NH}_2-\text{N} = \text{augmentation de l'azote aminé}; \text{PM} = \text{phosphore minéral})$$

et en abscisses le phosphore minéral en % du phosphore total, on obtient dans les deux séries d'expériences des courbes de même allure (courbe I de la fig. 2). On voit que tant que le phosphore minéral est inférieur à 50 % du phosphore total, le rapport croît lentement en restant voisin de 1; il croît par contre rapidement dès que la minéralisation atteint près des deux tiers du phosphore total.

La phosphopeptone II soumise aux mêmes traitements fournit une courbe d'allure différente (courbe II de la fig. 2).

*Interprétations des résultats.*

Comme nous l'avons vu plus haut, les phospho-peptides contiennent à l'extrémité de la chaîne qui porte le groupe aminé libre un reste de phospho-sérine. La résistance qu'opposent les phospho-peptides, tant qu'elles ne sont pas déphosphorylées, à l'action de l'amino-peptidase est en accord avec cette représentation. En effet, dans une communication précédente<sup>1)</sup>, nous avons montré que le reste phosphoryle protège contre l'hydrolyse enzymatique la liaison peptidique qui se trouve dans son voisinage: l'amino-peptidase s'attaquant aux peptides à partir de l'extrémité portant le groupe aminé libre, la résistance de la phospho-peptide intacte s'explique par la présence de phospho-sérine à cette extrémité.

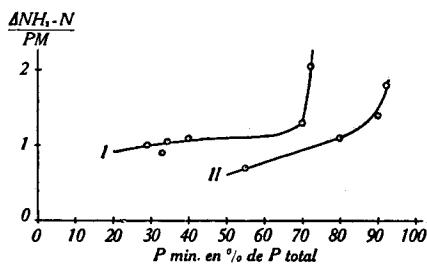


Fig. 2.

Pour expliquer les autres faits que nous avons signalés, nous nous représentons la structure des phospho-peptides et, en particulier, la position des deux autres restes phosphoryles de la manière suivante:

Phosphoséryl . phosphoséryl - - - phosphoséryl - - -  
Phospho-peptide I

Phosphoséryl . phosphoséryl - - - phosphosérine  
Phospho-peptide II

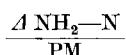
(chaque trait représente un reste d'acide aminé)

Le produit le plus dégradé (phospho-peptide II; heptapeptide) contient à l'extrémité de la chaîne portant le groupe aminé libre deux restes consécutifs de phospho-sérine; la troisième phospho-sérine est située à l'autre extrémité de la chaîne ou tout au moins dans son voisinage. Dans la phospho-peptide I (déca- ou endécapeptide) trois ou quatre acides aminés viennent encore s'enchaîner du côté du groupe carboxyle à la suite de cette troisième phospho-sérine. Par suite d'un effet d'empêchement stérique, ou pour toute autre raison, le groupe phosphoryle fixé à la partie centrale de la phospho-peptide I est plus résistant à l'action de la phosphatase que les deux phosphoryles situés à l'extrémité: c'est la raison pour laquelle, dans

<sup>1)</sup> *Helv.* **24**, 921 (1941).

nos conditions d'expérience, il ne s'élimine que deux P sur trois. Dans les mêmes conditions, la phospho-peptone II où les trois restes phosphoryles sont situés dans le voisinage des extrémités se laisse déphosphoryler complètement par l'enzyme.

L'amino-peptidase ne peut dégrader, comme nous l'avons vu, les phospho-peptides qu'après déphosphorylation. Dans la phospho-peptone I les deux restes phosphoryles situés à l'extrémité de la chaîne sont éliminés successivement sous l'action de la phosphatase, celui qui fait partie de la phospho-sérine terminale étant scindé plus rapidement que le deuxième. La peptidase peut alors détacher successivement les deux restes de sérine terminaux avec une vitesse dépendant de la vitesse de déphosphorylation. C'est la raison pour laquelle le rapport



est voisin de 1. Les deux phospho-séries une fois éliminées, l'attaque de la chaîne par la peptidase peut se poursuivre sans entraves, tout au moins jusqu'au voisinage du troisième reste phosphoryle, ce qui provoque une croissance rapide du rapport (courbe I de la fig. 1).

Cette représentation de la structure des phospho-peptides se trouve encore étayée des observations suivantes :

Nous avons traité la phospho-peptone I par le mélange aminopeptidase-phosphatase jusqu'à minéralisation de 41,3% du phosphore (1,2 at.) et augmentation de l'azote aminé représentant 12,1% de l'azote total (1,3 at.). Le produit dégradé que nous désignons comme produit A a été isolé; une partie en a été désaminée et, après hydrolyse, elle a fourni de l'acide glycérique décelable par la réaction d'Eegriwe-Rapoport. Le produit A a été soumis à une nouvelle attaque par la peptidase-phosphatase jusqu'à élimination de 39,9% de phosphore, l'augmentation de l'azote aminé étant 8,30% de l'azote total. Rapportée à la phospho-peptone I de départ, la perte totale subie au cours des deux dégradations successives est alors de 64,7% P, soit 1,94 at., et de 19,4% N, soit 2,13 at. Le deuxième produit de dégradation formé (produit B) a été isolé. Son produit de désamination n'a pas donné, après hydrolyse, la réaction de l'acide glycérique. Mais si l'on soumet le produit B à une action prolongée de la peptidase, on obtient un produit C qui, lui, fournit après désamination et hydrolyse la réaction de l'acide glycérique. Ces faits s'expliquent comme suit: Dans le produit B, les deux restes de phospho-sérine terminaux ont été éliminés et le groupe aminé libre fait partie d'un autre amino-acide. Dans le produit C, par suite d'une dégradation plus poussée, la troisième phospho-sérine est devenue le groupe portant le reste aminé libre de la chaîne.

Ces recherches permettent d'expliquer de la manière suivante la formation des phospho-peptides :

Elle est due, non pas à la nature ou au mode de liaison des amino-acides, mais bien à la présence des groupes phosphoryles dans les phospho-protéides. *Ces restes phosphoryles bloquant l'action des ferment pancréatiques (trypsine, amino-peptidase, carboxy-peptidase), il en résulte la formation de fragments résistant à une nouvelle dégradation enzymatique.*

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Préparation des phospho-peptones.

*Phospho-peptone I (N/P ~ 3,5).*

La préparation de cette phospho-peptone peut s'effectuer directement à partir de la caséine par deux jours de digestion pancréatique suivant une méthode déjà publiée<sup>1</sup>).

Nous avions à notre disposition sous forme de sel de calcium une certaine quantité d'un produit moins dégradé (contenant: 9,72 % N; 5,08 % P; 8,33 % Ca; N/P = 4,2). Il avait été préparé à partir de la caséine par une méthode analogue mais en présence d'une quantité plus faible de pancréatine. Nous l'avons alors soumis à une nouvelle digestion:

Une solution de 10 gr. de produit (débarrassé des ions de calcium par la quantité strictement nécessaire d'acide oxalique) dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau est additionnée de 280 cm<sup>3</sup> d'hydrogénocarbonate de sodium à 5,6%. On ajoute une suspension de 8 gr. de bouillie de pancréas de porc dans 20 cm<sup>3</sup> d'eau (la glande pancréatique avait été préalablement débarrassée de la graisse et du tissu conjonctif et conservée 48 heures à la glacière); pH = 8,6. Après addition de 20 cm<sup>3</sup> de toluène, on laisse 48 heures à l'étuve à 35°. Le liquide est ensuite filtré, acidulé à l'acide acétique et précipité par 70 cm<sup>3</sup> d'acétate neutre de plomb à 20%. Le précipité est essoré et lavé à fond à l'eau. On le tritue ensuite dans un mortier avec du carbonate de sodium 2-n. qu'on ajoute par petites portions, en vérifiant de temps en temps la réaction de la suspension au moyen du papier à la phénolphthaleine. Dès que la réaction alcaline subsiste pendant 3—4 minutes, on arrête l'addition de carbonate de sodium. On essore le précipité sur une couche de norite; le filtrat est acidulé à l'acide acétique et additionné de 35 cm<sup>3</sup> d'acétate de baryum à 20%, puis de 2 volumes d'alcool à 96%. Le précipité formé est essoré, lavé d'abord à l'alcool à 70%, puis à l'alcool fort et à l'éther; on le sèche dans le vide (6—8 gr.). Pour le purifier, on le dissout dans l'eau et on le précipite par l'alcool.

Composition des produits obtenus (à l'état anhydre):

	% N	% P	% Ba	N/P	NH <sub>2</sub> -N en % de N total
Préparation I . . .	6,68	4,16	37,0	3,56	9,3
Préparation II . . .	6,72	4,31	35,6	3,45	—
Préparation III . . .	8,48	5,15	28,3	3,65	9,2

La préparation III ayant été précipitée en milieu plus acide contenait moins de baryum.

La préparation I a été débarrassée des ions de baryum par la quantité strictement nécessaire d'acide sulfurique et soumise encore une fois à l'action du pancréas dans des conditions identiques aux précédentes. Des dosages d'après *van Slyke* montrent qu'au bout de 48 heures de digestion, il ne s'est pas produit d'augmentation sensible de l'azote aminé. Pas de phosphore minéral. Après 48 heures, le produit est isolé de la manière déjà décrite; sa teneur en azote aminé n'a que peu varié: NH<sub>2</sub>-N = 9,6 % de N total. Si, par contre,

<sup>1)</sup> S. Posternak, C. r. 186, 1762 (1928); Levene et Hill, J. Biol. Chem. 101, 711 (1933).

on traite la phospho-peptone par le pancréas en présence de *phosphatase des reins* de porc (6 P.E. par  $\text{cm}^3$ ), la déphosphorylation permet l'attaque du peptide; après défaillance des chiffres des témoins, on obtient les résultats suivants:

Temps en heures	P min. (en % de P du substrat)	Augmentation de N aminé (en % de N du substrat)
48	30,1	11,3
120	43,0	19,8

Une phospho-peptone libre (préparation *S. Posternak*) a été obtenue à partir de son sel de baryum par traitement au moyen de la quantité strictement nécessaire d'acide sulfurique suivi d'évaporation dans le vide, à température ordinaire, du filtrat du sulfate de baryum. Le produit avait la composition suivante:

C 39,78%; H 6,05%; N 10,84%; P 6,70%; N/P = 3,58  
 $[\alpha]_D^{16} = -58,8^\circ$ ; après neutralisation à l'ammoniaque  $[\alpha]_D^{16} = -83,5^\circ$ .

### *Phospho-peptone II.*

*Préparation à partir de la caséine.* La digestion de la caséine a été effectuée d'après les prescriptions de *G. Schmidt*<sup>1)</sup>; toutefois, la méthode d'isolement indiquée par cet auteur nous ayant fourni un produit impur d'une teneur en azote aminé trop faible, nous avons employé un autre procédé de purification:

On prépare une solution de 32 gr. de carbonate de sodium anhydre et de 30 gr. d'hydrogénocarbonate de sodium dans 4,5 litres d'eau. Après avoir chauffé à 40°, on suspend dans cette solution 500 gr. de caséine technique, puis on ajoute 5 gr. de pancreatinum absolutum *Merck* (contenant 0,034% P) et 45  $\text{cm}^3$  de toluène. On laisse à l'étuve à 38° et agite de temps en temps. Tous les deux jours, on introduit 5 gr. de pancréatine. Au bout de quatre semaines, le liquide est acidulé à l'acide acétique et filtré. Le filtrat est additionné d'acétate neutre de plomb jusqu'à défaut de précipitation. Le sel plombique est essoré, lavé à fond à l'eau et transformé en sel sodique par le carbonate de sodium 2-n. de la manière déjà décrite (voir préparation de la phospho-peptone I). N/P (dans la solution du sel sodique) = 3,63.

Pour purifier le produit on a recours à une méthode de précipitation fractionnée par l'alcool. Par addition d'environ 2 volumes d'alcool à 96% à la solution du sel sodique, ce dernier se dépose sous forme d'une huile épaisse. Après décantation du liquide surageant, cette huile est redissoute dans l'eau et précipitée à nouveau par l'alcool et cette suite d'opérations, dont le tableau suivant indique la marche, est répétée plusieurs fois:

La solution de départ (350  $\text{cm}^3$ ) contenait 1125 mg. P; N/P = 3,63; elle provenait de 300 gr. de caséine.

On voit que le rapport at. N/P finit après avoir atteint 2,6 par ne plus varier sensiblement.

Le dernier sel sodique obtenu (N/P = 2,63) est transformé en sel de baryum par addition d'acétate de baryum à 20% (15  $\text{cm}^3$ ) à sa solution et précipitation par 2 volumes d'alcool (3,8 gr.). On purifie le produit par dissolution dans l'eau et reprécipitation par l'alcool.

Trouvé (substance anhydre):

N 7,36%; P 6,03%; Ba 28,06%;  $\text{NH}_2\text{—N}$  (en % de N total) 12,14%; N/P = 2,69.

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. 223, 86 (1934).

N° de l'opération	Vol. de la solution du sel sodique en cm <sup>3</sup>	Vol. de l'alcool introduit en cm <sup>3</sup>	Huile déposée	
			Quantité de P contenu en mgr.	Rapport at. N/P
1	350	750	746	3,11
2	350	750	—	—
3	100	200	408	2,74
4	100	200	—	—
5	80	85	279	2,66
6	80	160	206	2,63

*Préparation à partir d'une phospho-peptone.* Le produit de départ était un sel calcique de phospho-peptone (N/P = 4,20).

10 gr. sont débarrassés des ions de calcium par la quantité strictement nécessaire d'acide oxalique. La solution (vol. 120 cm<sup>3</sup>) est additionnée ensuite de 280 cm<sup>3</sup> d'hydrogénocarbonate de sodium à 5,6%, de 2 gr. de pancreatinum absolutum *Merck* et enfin de 20 cm<sup>3</sup> de toluène. On laisse à l'étuve à 35° et ajoute tous les deux jours 2 gr. de pancréatine. Le produit de dégradation a été isolé d'après la méthode indiquée par *Schmidt*. Au bout de 4 semaines de digestion, le liquide est acidifié à l'acide acétique, filtré et précipité par l'acétate de plomb. Le précipité plombique, lavé soigneusement à l'eau, est décomposé par l'hydrogène sulfuré; le filtrat du sulfure de plomb, débarrassé de l'excès d'hydrogène sulfuré par un courant d'air, est précipité à nouveau par l'acétate de plomb. Cette suite d'opérations est répétée quatre fois. Finalement, le filtrat du sulfure de plomb, après passage d'un courant d'air, est neutralisé à la baryte (phénolphtaléine) et précipité par 1/4 de vol. d'alcool. On purifie le sel de baryum par dissolution dans l'eau et précipitation par l'alcool (2,5 gr.).

Trouvé dans la substance anhydre:

N 6,04%; P 5,66%; Ba 35,5%; NH<sub>2</sub>—N (en % de N total) 14,37%; N/P = 2,37.

La phospho-peptone libre a été préparée en traitant une solution du produit précédent par la quantité d'acide sulfurique strictement nécessaire pour précipiter les ions de baryum. Le filtrat du sulfate de baryum est évaporé à sec à température ordinaire dans l'exsiccateur à vide; il reste un vernis qui après dessiccation prolongée devient friable.

4,471 mgr. subst. ont donné 5,645 mgr. CO<sub>2</sub> et 2,160 mgr. H<sub>2</sub>O

72,8 mgr. subst. ont consommé (*Kjeldahl*) 5,10 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1-n.

18,2 mgr. subst. ont donné 0,2252 gr. SPMoBa<sup>1</sup>)

C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>26</sub>N<sub>7</sub>P<sub>3</sub> Calculé C 35,33 H 5,14 N 9,62 P 9,11%

Trouvé „, 34,43 „, 5,41 „, 9,80 „, 9,14%

Polarimétrie:

c = 1,952%; t = 21°; l = 1 dm;  $\alpha = -0,77^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{21} = -39,4^\circ$ .

Les phospho-peptones I et II ont les propriétés suivantes: réaction rouge-violet du biuret; sont négatives les réactions de *Millon*, de *Hopkins-Cole*, xanthoprotéique et de *Molisch*. Sels de métaux lourds insolubles, sels alcalins et alcalino-terreux solubles. Formation d'acide pyruvique et d'ammoniaque par une ébullition d'une minute en présence de NaOH-n.<sup>2</sup>).

<sup>1)</sup> SPMoBa = Sulfo-phospho-molybdate de baryum; voir *S. Posternak*, Bl. [4] 27, 507 et 564 (1920).

<sup>2)</sup> *S. et Th. Posternak*, C. r. 187, 313 (1928).

### Produits d'hydrolyse des phospho-peptides.

*Dosage de la sérine<sup>1</sup>.* — Une partie de phospho-peptide (sous forme d'acide libre) est hydrolysée par une ébullition à reflux de 30 heures en présence de 30 parties d'acide chlorhydrique à 18%. Dans des parties aliquotes de l'hydrolysat, on dose l'azote total et l'ammoniaque (ce dernier dosage par distillation en présence d'un excès de magnésie). D'autre part, 1 cm<sup>3</sup> de l'hydrolysat est dilué à 10 cm<sup>3</sup>; 0,5 cm<sup>3</sup> de cette solution + 1,5 cm<sup>3</sup> d'eau + 0,15 cm<sup>3</sup> HCl 2-n. sont chauffés au bain-marie; on introduit goutte à goutte 1 cm<sup>3</sup> NaNO<sub>2</sub> à 2,5%. On évapore à sec, ajoute deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré et évapore de nouveau à sec. On introduit 2 cm<sup>3</sup> d'une solution fraîchement préparée à 0,1% de naphtorésorcine dans l'acide sulfurique concentré et chauffe 1 heure au bain-marie bouillant. On dilue enfin à 25 cm<sup>3</sup> par l'acide sulfurique concentré. La coloration bleue obtenue est comparée au colorimètre *Duboscq* à celle d'une solution standard obtenue de la manière suivante:

0,3 cm<sup>3</sup> d'une solution de 100 mgr. de sérine pure dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau + 2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O + 0,15 cm<sup>3</sup> HCl 4-n. + 1 cm<sup>3</sup> NaNO<sub>2</sub> à 2,5%. On chauffe au bain-marie et traite par la naphtorésorcine sulfurique ainsi qu'il a été indiqué ci-dessus.

*Dosage des acides oxy-aminés.* — Un hydrolysat de phospho-peptide est préparé comme ci-dessus. On l'évapore plusieurs fois à sec dans le vide, chaque fois après addition d'eau, de manière à éliminer la majeure partie de l'acide chlorhydrique et on ramène ensuite environ au volume primitif. Après neutralisation par NaHCO<sub>3</sub> 1-m., on ajoute 2 vol. de KIO<sub>4</sub> + KOH 0,25-m. et on laisse 10 min. à température ordinaire.

Une partie de la solution est acidulée par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> au papier Congo; on entraîne ensuite à la vapeur d'eau dans le vide. Le distillat traité par la dimédone dépose des cristaux de combinaison dimédonique de l'aldéhyde formique qui fondent à 189° de même que leur mélange avec un échantillon authentique.

L'ammoniaque contenue dans une autre partie de la solution (de teneur en azote total connue) est déterminée après entraînement en présence de magnésie.

Phospho-peptide	Nombre d'ac. aminés	% de N de l'hydrolysat		Sérine totale		Ac. oxy-aminés	
		NH <sub>3</sub>	sérine	en % de N total	Nomb. demol.	en % de N total	Nomb. demol.
I (N/P = 3,65)	11	11,7	31,5	43,2	4,8	42,1	4,6
II (N/P = 2,69)	8	11,3	37,7	49,0	3,9	—	—
II (N/P = 2,37)	7	13,2	29,2	42,4	3,0	46,5	3,3

Dans des essais spéciaux nous avons constaté que si l'on traite 30 heures à l'ébullition à reflux une partie de *l*(+)-isoleucine ou une partie d'acide *l*(+)-glutamique par 15 parties HCl à 20%, il ne se forme guère d'ammoniaque (réaction de *Nessler*). Traité dans les mêmes conditions, la *l*-sépine fournit de l'ammoniaque mais pas trace d'acide glycérique<sup>2</sup>: une quantité de liquide acide correspondant à 5,0 mgr. de sérine n'a pas donné de coloration bleue avec la naphto-résorcine, alors que la réaction d'*Eegriewe-Rapoport* permet de déceler encore 10 γ d'acide glycérique.

### Isollement des produits d'hydrolyse.

Notre mode opératoire fut le suivant:

La phospho-peptide est traitée 30 h. à l'ébullition à reflux par 20 parties d'acide chlorhydrique à 18%. On épouse ensuite à l'éther, dans un appareil à extraction continue, pour retirer l'acide pyruvique. Après évaporation de la solution éthérée, on isole l'acide cétonique suivant le procédé habituel, comme 2,4-dinitro-phénylhydrazone qu'on purifie par dissolution dans le carbonate de sodium, précipitation par l'acide chlorhydrique et

<sup>1</sup>) *Rapoport*, Bioch. Z. 289, 422 (1937).

<sup>2</sup>) Contrairement aux indications de *Damodaran* et *Ramachandran*, loc. cit.

recristallisation dans l'éther acétique. P. de f. 212°; le mélange avec un échantillon authentique fond à la même température. La quantité d'acide pyruvique ainsi isolée ne représente en raison de la destruction subie au cours de l'hydrolyse que 30% environ de la quantité correspondant à l'ammoniaque formée par altération de la sérine<sup>1)</sup>.

Après l'extraction à l'éther, l'hydrolysat est concentré dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. Suivant le procédé habituel, on en isole l'acide glutamique sous forme de chlorhydrate en saturant de gaz chlorhydrique et en laissant cristalliser à la glacière. Les eaux-mères du chlorhydrate d'acide glutamique sont concentrées et saturées à nouveau de gaz chlorhydrique ce qui provoque parfois une nouvelle cristallisation. L'acide glutamique libéré de son chlorhydrate par un équivalent de soude caustique est recristallisé dans l'eau; un échantillon obtenu ainsi à partir d'une phospho-peptone II (N/P = 2,69) fondait à 208°; son mélange avec un échantillon d'acide *l*(+)-glutamique pur *Hoffmann-La Roche* (p. de f. 210°) fondait à 209°.

0,1202 gr. subst. ont consommé (*Kjeldahl*) 8,12 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1-n.

C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>N Calculé N 9,52 Trouvé N 9,46%

Examen optique de la substance dissoute dans un équivalent HCl:

c = 0,1502%; t = 20°; l = 1 dm;  $\alpha$  = +0,42°;  $[\alpha]_D^{20}$  = + 28,0°.

On trouve dans la littérature les données suivantes pour la rotation spécifique du chlorhydrate de l'acide *l*(+)-glutamique:

*E. Fischer*  $[\alpha]_D^{20}$  = + 30,85<sup>02)</sup>; *Wood*  $[\alpha]_D^{25}$  = + 27,91<sup>03)</sup>; *Menozzi et Appiani*  $[\alpha]_D^{15}$  = + 27,50<sup>04)</sup>

Les eaux-mères du chlorhydrate de l'acide glutamique sont débarrassées de la majeure partie de leur acide chlorhydrique par évaporation à sec dans le vide. On reprend par l'eau et précipite l'acide phosphorique par addition de baryte jusqu'à réaction alcaline. Le précipité est essoré et lavé à l'eau chaude. On évapore le liquide dans le vide de manière à chasser l'ammoniaque, puis on précipite Ba<sup>++</sup> par la quantité strictement nécessaire d'acide sulfurique. Le liquide est débarrassé des ions Cl<sup>-</sup> par agitation en présence d'oxyde d'argent puis des ions Ag<sup>+</sup> par l'hydrogène sulfuré. Après évaporation dans le vide, on obtient un résidu cristallisé qui représente essentiellement un mélange de sérine et d'iso-leucine (lorsqu'on est parti d'une phospho-peptone I, il contient encore de l'acide aspartique) dont la séparation s'effectue comme d'habitude par l'intermédiaire des sels de cuivre. Le mélange dissous dans 100 parties d'eau est donc traité 30 min. à l'ébullition par un excès d'hydroxyde de cuivre(II) fraîchement précipité et soigneusement lavé. On essore à chaud l'excès d'hydroxyde de cuivre qu'on lave à l'eau bouillante. Les filtrats réunis sont concentrés dans le vide à un petit volume; on introduit quelques cristaux d'aspartate de cuivre(II) et abandonne une nuit à la glacière pour faire cristalliser l'aspartate de cuivre éventuellement présent. Si l'on est parti d'une phospho-peptone II, on ne peut déceler d'acide aspartique. La solution est évaporée alors à sec dans le vide. Pour isoler l'iso-leucine, on met à profit la propriété de son sel de cuivre(II) de se dissoudre dans l'alcool méthylique (1:55 à 17°). On extrait donc le résidu par de petites quantités successives d'alcool méthylique jusqu'à ce que les extraits ne soient plus colorés que très faiblement en bleu. Les solutions méthyliques réunies sont évaporées à sec dans le vide; on reprend le résidu par l'eau et débarrasse la solution de Cu<sup>++</sup> par un courant d'hydrogène sulfuré. Le filtrat du sulfure de cuivre(II) est évaporé à sec et le résidu d'iso-leucine est recristallisé dans l'alcool à 60% d'où il se sépare en paillettes nacrées caractéristiques. P. de f. 279°; le mélange avec un échantillon authentique de *l*(+)-iso-leucine fondant à 280° avait un p. de f. de 279°.

4,560; 4,800 mgr. subst. ont donné 0,4508; 0,4704 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (716 mm; 19°; 718 mm; 20,5°)

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N Calculé N 10,69 Trouvé 10,89; 10,77%

<sup>1)</sup> *S. et Th. Posternak*, C. r. **185**, 615 (1927).

<sup>2)</sup> *B. 32*, 2470 (1899).

<sup>3)</sup> *Soc. 105*, 1991 (1914).

<sup>4)</sup> *Atti accad. Lincei* [4] **7**, I, 34.

Les sels de cuivre restés insolubles dans l'alcool méthylique sont dissous dans l'eau et décomposés par l'hydrogène sulfuré; le filtrat du sulfure de cuivre est évaporé à sec dans le vide; le résidu consiste essentiellement en sérine que, lors de certaines opérations on a pu obtenir à l'état pur par recristallisations répétées dans l'alcool aqueux. Il est toutefois préférable d'isoler cette sérine sous forme de son dérivé  $\beta$ -naphtalène-sulfonylé. La substance brute est donc traitée par le chlorure de  $\beta$ -naphtalène-sulfonyle et la soude, dans les conditions indiquées par *E. Fischer et Bergell*<sup>1)</sup>. Après acidification par l'acide chlorhydrique, le produit précipité est essoré et lavé. On le reprend par un peu d'alcool froid pour dissoudre quelques résines; l'insoluble est recristallisé par dissolution dans la quantité minimum d'alcool chaud suivie d'addition d'eau jusqu'à trouble persistant. Lors d'une opération à partir d'une phospho-peptone II (N/P = 2,69) 300 mgr. de sérine brute ont fourni ainsi 128 mgr. de dérivé naphtalène-sulfonylé recristallisé fondant à 226°; dans un essai parallèle, 300 mgr. de *l*(-)-sérine pure traitée dans les mêmes conditions nous ont donné 147 mgr. du même dérivé fondant à 228°. P. de f. du mélange 227°.

3,975; 3,700 mgr. subst. ont donné 7,730; 7,220 mgr. CO<sub>2</sub> et 1,590; 1,490 mgr. H<sub>2</sub>O 86,22 mgr. subst. ont consommé (*Kjeldahl*) 2,98 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1-n.

C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>NS      Calculé C 52,88      H 4,44      N 4,74%  
Trouvé „ 53,04; 53,22 „ 4,48; 4,53 „ 4,83%

c = 0,958% (dans NaOH-n.); t = 17°; l = 1 dm;  $\alpha = -0,59^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{17} = -61,6^\circ$ .

Examiné dans les mêmes conditions, le produit obtenu à partir de la *l*(-)-sérine pure a donné  $[\alpha]_D^{17} = -62,6^\circ$ .

Le dérivé naphtalène- $\beta$ -sulfonylé de la sérine optiquement active ne semble pas encore avoir été décrit. *Fischer et Bergell* indiquent un point de fusion de 208° pour le dérivé de la *d*,*l*-sérine. Comme nous venons de l'indiquer, le dérivé de la *l*(-)-sérine préparé à partir d'un acide oxy-aminé pur fond à 228°; le point de fusion de 209° indiqué par *Levene et Hill*<sup>2)</sup> était sans doute celui d'un produit incomplètement purifié.

Lors d'une expérience effectuée à partir d'une phospho-peptone II (N/P = 2,69; octapeptide), l'hydrolysat contenait 146 mgr. N dont 11,6% sous forme d'ammoniaque. On a obtenu 0,51 gr. de chlorhydrate d'acide glutamique soit 2,2 mol. Le mélange brut de sérine et d'iso-leucine pesait 0,47 gr.; l'iso-leucine en représentait environ un quart.

### *Phospho-peptones désaminées. Présence d'acide glycérique parmi leurs produits d'hydrolyse.*

*Préparation des phospho-peptones désaminées:* 1 gr. de sel de baryum de la phospho-peptone est dissous dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau. On ajoute 7 cm<sup>3</sup> d'une solution de 3 parties de nitrite de sodium dans 10 parties d'eau, puis on introduit lentement et en agitant, en refroidissant par l'eau glacée, 2 cm<sup>3</sup> d'acide acétique glacial. Après un séjour de 5 minutes à température ordinaire, on précipite la phospho-peptone désaminée par deux volumes d'alcool. Le produit est purifié par dissolution dans l'eau et reprécipitation par l'alcool.

	% P	% N	% Ba	N/P
Phospho-peptone I (sel de Ba) . . .	4,16	6,68	37,0	3,56
Produit de désamination . . . . .	4,81	6,95	32,9	3,20
Phospho-peptone II (sel de Ba) . . .	5,66	6,04	35,5	2,37
Produit de désamination . . . . .	5,93	5,45	—	2,03

*Dosage d'acide glycérique dans l'hydrolysat:* 100 mgr. environ de produit désaminé sont traités 30 heures à l'ébullition à reflux avec 4 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique à 18%. Dans 0,2 cm<sup>3</sup> de l'hydrolysat on dose l'acide glycérique d'après *Eegriwe-Rapoport*<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> B. 35, 3779 (1902).      <sup>2)</sup> loc. cit.

<sup>3)</sup> Bioch. Z. 289, 406 (1937); voir *Th. Posternak et H. Pollaczek*, Helv. 24, 926 (1941).

On décèle ainsi environ 50% de la quantité à laquelle il aurait fallu s'attendre suivant l'hypothèse de la présence d'une molécule d'acide glycérique par molécule de phosphopeptone désaminée. Nous expliquons le déficit par la sensibilité, en présence de l'acide minéral bouillant, de l'acide phospho-glycérique engagé en combinaison.

Nous nous sommes assurés que si l'on soumet les phospho-peptides au même traitement sans les avoir désaminées préalablement, on ne peut déceler l'acide glycérique dans leur hydrolysat.

### Déphosphorylation des phospho-peptides.

#### Déphosphorylations par la phosphatase des reins et par l'alcali.

On prépare des solutions des sels de sodium des quatre substances suivantes (les concentrations sont ajustées de manière à ce que 1 cm<sup>3</sup> de chacune des solutions contienne environ 0,4 mgr. P):

- 1) phospho-peptone I (N/P = 3,56)
- 2) phospho-peptone II (N/P = 2,37; heptapeptide)
- 3) acide dipeptide-phosphorique
- 4) acide sérine-phosphorique

a) *Déphosphorylation par la phosphatase des reins*: 5 cm<sup>3</sup> de chacune des quatre solutions + 1 cm<sup>3</sup> MgSO<sub>4</sub> + 7 H<sub>2</sub>O à 1% + 9 cm<sup>3</sup> de mélange tampon véronal-acide chlorhydrique de pH 9,1 + 5 cm<sup>3</sup> de suspension de phosphatase des reins de porc (42 P.E.)<sup>1)</sup> + quelques gouttes de toluène. Mis au thermostat à 36°; dosé le phosphore minéral dans des parties aliquotes des quatre solutions<sup>2)</sup>. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

P minéral en % de P total

	3 h.	7 h.	24 h.	32 h.	45 h.	55 h.	96 h.
Phospho-peptone I	31,9	38,6	51,7	—	58,1	59,0	—
Phospho-peptone II	50,8	67,4	81,9	—	84,1	86,8	97,7
Acide dipeptide-phosphorique . .	78,8	85,9	—	94,8	—	—	100
Acide sérine-phosphorique . .	92,5	94,1	—	—	—	—	—

b) *Déphosphorylation par l'alcali*: 5 cm<sup>3</sup> de chacune des quatre solutions + 5 cm<sup>3</sup> NaOH 0,5-n. Laissé 24 h. à 37°, puis dosé le phosphore minéral.

	P minéral en % de P total
Phospho-peptone I . . . . .	96,2
Phospho-peptone II . . . . .	95,4
Acide dipeptide-phosphorique . . .	9,3
Acide sérine-phosphorique . . .	7,7

<sup>1)</sup> E. et A. Albers, Z. physiol. Ch. **237**, 193 (1935).

<sup>2)</sup> Pour doser le phosphore minéral en présence de phosphore organique, nous avons toujours procédé comme suit: le phosphore minéral précipité par la mixture magnésienne a été filtré, puis redissous dans l'acide sulfurique dilué; il a été dosé finalement comme sulfo-phospho-molybdate de baryum. Cf. Bl. [4] **27**, 507 et 564 (1920).

### Action du periodate après déphosphorylation enzymatique.

On prépare une solution de sel sodique de phospho-peptone I de  $p_{\text{H}}$  8,5 ( $\text{N}/\text{P} = 3,65$ ; 1  $\text{cm}^3$  contient 0,58 mgr. P).

a) 1  $\text{cm}^3$  de cette solution est additionné de 1  $\text{cm}^3$  de  $\text{KIO}_4 + \text{KOH}$  0,25-m.; au bout de 10 min. on additionne de réactif de *Nessler*: il ne se produit aucune coloration.

b) La solution de phospho-peptone est traitée au thermostat à 35° par la phosphatase des reins (40 P.E. par  $\text{cm}^3$ ). Dès le début de la déphosphorylation (au bout de 15 min.) le liquide traité comme ci-dessus par le periodate donne avec le réactif de *Nessler* une coloration et un précipité gris-brun dus à la présence simultanée d'ammoniaque et d'aldéhyde formique. Cette réaction augmente d'intensité avec la déphosphorylation. Le dosage de l'ammoniaque formée présentant des difficultés en présence de phospho-peptone, nous nous contentons pour le moment de ces indications qualitatives.

La solution de phospho-peptone laissée au thermostat en l'absence de phosphatase donne une réaction négative.

### Dégradations par l'amino-peptidase de l'intestin de porc.

La solution d'amino-peptidase d'intestin de porc a été préparée d'après les indications d'*Abderhalden* et *Greif*<sup>1)</sup>.

Activité: 2,5  $\text{cm}^3$  de *l*-leucyl-glycyl-glycine 0,1-m. + 7,5  $\text{cm}^3$  d'enzyme  $p_{\text{H}}$  7,0; scission après 45 min. à 36°: 35%.

### Actions comparées de l'amino-peptidase en présence et en l'absence de phosphatase des reins:

1) 7,5  $\text{cm}^3$  d'une solution de phospho-peptone sodique (1  $\text{cm}^3$  contient 3,91 mgr. P;  $\text{N}/\text{P} = 3,6$ ) + 22,5  $\text{cm}^3$  de solution d'amino-peptidase + 25 mgr. de phosphatase des reins (312 P.E.) + 1  $\text{cm}^3$  de toluène.

2) Comme en 1) en remplaçant la solution de phospho-peptone par 7,5  $\text{cm}^3$  d'eau.

3) Comme en 1) mais sans phosphatase.

4) 7,5  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{O} + 22,5 \text{ cm}^3$  de solution d'amino-peptidase + 1  $\text{cm}^3$  de toluène.

$p_{\text{H}}$  = 7,8; ce  $p_{\text{H}}$  se maintient suffisamment constant pour qu'il soit inutile d'introduire un mélange-tampon. Mis à l'étude à 36°. Les chiffres de l'essai 2) ont été soustraits de ceux de l'essai 1); ceux de l'essai 3) de ceux de l'essai 4).

	Temps en heures	$\Delta \text{NH}_2\text{-N}$	PM =	$\Delta \text{NH}_2\text{-N}$
		augmentation de N aminé (en % de N total)	P minéral (en % de P total)	PM (en at.)
avec phosphatase des reins	67	9,1	46,1	0,72
	115	13,4	49,1	1,00
sans phosphatase des reins	67	2,7	11,3	0,86
	115	2,8	13,6	0,77

On voit qu'en présence de phosphatase des reins, la forte déphosphorylation produite permet une augmentation considérable de l'azote aminé.

<sup>1)</sup> Fermentforschung 15, 311 (1937).

*Actions simultanées et successives de la phosphatase des reins et de l'amino-peptidase.*

*Phospho-peptone I:*

A) 1) 15 cm<sup>3</sup> de solution de sel sodique de phospho-peptone I (N/P = 3,6; 1 cm<sup>3</sup> contient 3,91 mgr. P) + 45 cm<sup>3</sup> de solution d'amino-peptidase + 40 mgr. de phosphatase des reins de porc (500 P.E.) + 2 cm<sup>3</sup> de toluène.

2) Comme en 1) en remplaçant les 15 cm<sup>3</sup> de solution de substrat par 15 cm<sup>3</sup> d'eau.

p<sub>H</sub> = 7,8. Laissé à l'étuve à 36°. Les chiffres de l'essai 2) ont été soustraits de ceux de l'essai 1).

Série	Temps en heures	PM = P minéral (en % de P total)	$\frac{\Delta \text{NH}_2\text{-N}}{\text{PM}} = \text{augmentation de N aminé}$ (en % de N total)	$\frac{\Delta \text{NH}_2\text{-N}}{\text{PM}}$ (en at.)
I	26	28,4	6,6	0,85
	43	34,8	7,8	0,82
	96	48,8	13,9	1,04
	168	55,9	15,9	1,03
II <sup>1)</sup>	48	20,6	4,5	0,79
	90	41,5	11,6	1,01
	215	64,4	30,9	1,75

B) Une solution de phospho-peptone sodique (N/P = 3,6; 1 cm<sup>3</sup> contient 3,91 mgr. P) est additionnée de phosphatase des reins (16 P.E. par cm<sup>3</sup>). p<sub>H</sub> = 8,0. Mis à l'étuve à 36°. A diverses reprises des parties aliquotes du liquide sont prélevées, acidulées par quelques gouttes d'acide acétique et chauffées 10 minutes au bain-marie bouillant pour détruire la phosphatase. Après dosage du P minéral dans les parties aliquotes ainsi traitées, on ajoute 2 volumes de solution d'amino-peptidase, laisse à l'étuve durant 88 heures et détermine le rapport  $\frac{\Delta \text{NH}_2\text{-N}}{\text{PM}}$ . A ce moment l'augmentation de l'azote aminé fort rapide au début s'est considérablement ralenti; elle ne s'arrête d'ailleurs jamais complètement; en effet sous l'action de la phosphatase intestinale contenue dans la solution de peptidase, il se produit une minéralisation lente du phosphore qui permet à la peptidase de poursuivre l'attaque. Ayant laissé au total encore 120 heures à l'étuve, nous avons déterminé les nouveaux rapports formés.

Le tableau suivant indique les rapports atomiques  $\frac{\Delta \text{NH}_2\text{-N}}{\text{PM}}$  observés en fonction du phosphore minéral.

P minéral en % de P total	$\frac{\Delta \text{NH}_2\text{-N}}{\text{PM}}$
28,8	1,02
33,2	0,89
34,5	1,06
39,6	1,12
69,8	1,27
72,3	2,07

<sup>1)</sup> La phosphatase employée était affaiblie.

On constate une forte croissance du rapport  $\frac{4\text{NH}_2\text{--N}}{\text{PM}}$  une fois que le PM a atteint près de 60 % du P total.

*Phospho-peptone II:*

1) 10 cm<sup>3</sup> de solution de sel sodique de phospho-peptone II (N/P = 2,37; 1 cm<sup>3</sup> contient 1,64 mgr. P) + 30 cm<sup>3</sup> de solution d'amino-peptidase + 15 mgr. de phosphatase des reins (210 P.E.) + 1 cm<sup>3</sup> de toluène.

2) Comme en 1) en remplaçant les 10 cm<sup>3</sup> de solution de substrat par 10 cm<sup>3</sup> d'eau.  $\text{p}_\text{H} = 8,0$ . Laissé à l'étuve à 36°. Les chiffres de l'essai 2) ont été soustraits de ceux de l'essai 1).

Temps en heures	$\Delta \text{NH}_2\text{--N} = \text{augmentation de N aminé}$ (en % de N total)	PM = P minéral (en % de P total)	$\frac{4\text{NH}_2\text{--N}}{\text{PM}}$ (en at.)
18	16,2	55,0	0,70
48	37,5	79,8	1,11
90	53,6	90,1	1,42
138	70,0	91,9	1,81

*Isolement des produits formés par l'amino-peptidase en présence de phosphatase:*

1) 60 cm<sup>3</sup> d'une solution à 5% de phospho-peptone sodique I (N/P = 3,65; NH<sub>2</sub>—N = 9,2% de N total) + 30 cm<sup>3</sup> de solution d'amino-peptidase + 60 mgr. de phosphatase (900 P.E.).  $\text{p}_\text{H} = 8,0$ . Laissé 140 heures à 37° en présence de toluène; le P minéral représente alors 41,3% de P total et l'augmentation de l'azote aminé est de 12,1% de N total. Notre phospho-peptone de départ contenant trois acides phosphoriques et 11 acides aminés, on peut dire que sous l'action des ferment, il s'est produit une perte de 1,24 at. P et de 1,33 mol. d'amino-acide.

Pour isoler le produit phosphorylé dégradé, on procède comme suit: le liquide filtré est ramené par l'acide acétique à  $\text{p}_\text{H}$  7, puis additionné de 15 cm<sup>3</sup> d'acétate de plomb à 20%. Le précipité formé est essoré et lavé; on le décompose à froid par le carbonate de sodium à 10%. La solution de sel de sodium est filtrée, acidifiée à l'acide acétique et additionnée de 10 cm<sup>3</sup> d'acétate de baryum à 20%. On précipite le sel de baryum par 2 volumes d'alcool, on l'essore et on le lave à l'alcool et à l'éther. Le produit sec est repris par l'eau. On élimine par centrifugation une partie insoluble; la solution légèrement trouble est acidifiée par quelques gouttes d'acide acétique glacial, ce qui provoque la formation d'un léger précipité. Le liquide est filtré et additionné de 3 volumes d'alcool. Le précipité formé est essoré, lavé à l'alcool et à l'éther (1 gr.). Il contient à l'état anhydre: 7,34% N; 3,29% P; 32,70% Ba; NH<sub>2</sub>—N = 8,61 % de N total; N/P = 4,95.

Une petite partie (100 mgr.) du produit est désaminée dans les conditions décrites plus haut. Après hydrolyse acide, le produit donne la réaction de l'acide glycérique (décelé d'après *Eegriwe-Rapoport* 47% de la quantité attendue).

2) Le produit précédent de rapport N/P = 4,95 est débarrassé des ions de baryum; on le soumet à une nouvelle action simultanée de la phosphatase et de la peptidase dans des conditions identiques aux précédentes. Au bout de 70 heures de séjour à 37° le P minéral atteignait 39,9% du P total et l'augmentation de l'azote aminé représentait 8,30% de l'azote total. Rapportée à la phospho-peptone de départ qui contenait 3 acides phosphoriques et 11 acides aminés, la perte totale subie au cours des deux dégradations successives est de 64,7% du phosphore, soit 1,94 at. P, et de 19,37% de l'azote, soit 2,13 amino-acides. Le produit dégradé a été isolé du digestat de la même manière que précédemment. Après désamination et hydrolyse, il n'a pas donné de réaction d'acide glycérique.

3) 200 cm<sup>3</sup> de solution à 5% de phospho-peptone sodique (N/P = 3,65) + 100 cm<sup>3</sup> de solution d'aminopeptidase + 60 mgr. (840 P.E.) de phosphatase des reins. pH = 7,8. Laissé 16 jours à l'étuve en présence de toluène (au bout de 5 jours on avait ajouté encore 30 mgr. de phosphatase). Le phosphore minéral représente alors 60,4% du P total (1,83 at. P) et l'augmentation de N aminé atteint 26,2% de N total (perte de 2,89 mol. d'acides aminés). Le produit dégradé a été isolé sous forme de sel de baryum. Ce sel (3,25 gr.) a été débarrassé des ions de baryum par l'acide sulfurique. Sa solution (30 cm<sup>3</sup>) a été ensuite additionnée de 60 cm<sup>3</sup> d'aminopeptidase. pH = 7,0. Laissé 8 jours à 37°, on isole alors le produit dégradé; après désamination et hydrolyse, il fournit une forte réaction d'acide glycérique d'après *Eegriwe-Rapoport*.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1) En soumettant la caséine à une digestion pancréatique relativement courte, on obtient des peptides phosphorés (phosphopeptides I) formés de 10—11 acides aminés et estérifiés par 3 acides phosphoriques qui ne se laissent plus dégrader que très lentement par les ferment du pancréas. Ils sont dégradés beaucoup plus rapidement par les ferment pancréatiques après déphosphorylation enzymatique.

2) Par une digestion pancréatique beaucoup plus longue, on obtient des peptides plus dégradés (phosphopeptides II). La substance la plus dégradée que nous ayons préparée avait la composition d'un heptapeptide estérifié par 3 acides phosphoriques. Contrairement aux indications de *Schmidt*, il ne se forme pas d'acide dipeptide-phosphorique.

3) A l'hydrolyse la phosphopeptone II fournit les acides aminés suivants: sérine, acide glutamique, iso-leucine. La phosphopeptone I contient en outre de l'acide aspartique. Les 3 acides phosphoriques sont fixés à des restes de sérine.

4) Les phosphopeptides désaminées par l'acide nitreux fournissent, après hydrolyse, de l'acide glycérique; après déphosphorylation enzymatique, les phosphopeptides sont attaquées par le periodate avec formation d'aldéhyde formique et d'ammoniaque. Ces faits indiquent la présence à l'extrémité de la chaîne portant le groupe amino libre d'un reste d'acide sérine-phosphorique.

5) Sous l'action de la phosphatase des reins, la phosphopeptone II est déphosphorylée complètement alors que, dans les mêmes conditions, la phosphopeptone I ne perd que 2 restes phosphoryles sur 3.

6) Les phosphopeptides intactes résistent à l'action de l'aminopeptidase; elles se laissent dégrader par contre après déphosphorylation enzymatique.

7) Pour expliquer la marche des dégradations enzymatiques, nous nous représentons de la manière suivante la position des restes phosphoryles:

Dans la phospho-peptone I, deux restes consécutifs de phospho-sérine sont placés à l'extrémité de la chaîne portant le groupe amino libre; le troisième reste phosphoryle est fixé à la partie centrale de la chaîne. Dans la phospho-peptone II, par suite du raccourcissement de la chaîne, cette troisième phospho-sérine se trouve située dans le voisinage de l'autre extrémité de la chaîne peptidique.

8) La formation des phospho-peptones est due essentiellement au blocage de l'action des fermentes pancréatiques par les restes phosphoryles.

Genève, Laboratoire de Chimie inorganique  
et organique de l'Université.

**138. Über isostere und strukturähnliche Verbindungen XIII.  
Zur Kenntnis des Furyl-isopropylamins und anderer Amine  
der Furanreihe**

von H. Erlenmeyer und Marion Simon.

(15. IX. 41.)

Die Derivate der „aromatischen“ Ringe Thiophen und Furan zeigen deutliche Ähnlichkeiten in den verschiedensten Eigenschaften mit den entsprechenden Derivaten des Benzols. Die Verwandtschaft, die beim Paar Benzol-Thiophen besonders ausgeprägt ist, hat zu zahlreichen experimentellen Untersuchungen geführt. Weniger ausgesprochen und unter diesem Gesichtspunkt seltener untersucht sind die Beziehungen der Chemie des Furans zu der Benzolchemie. Aber auch einige Derivate dieser beiden aromatischen Ringe zeigen Übereinstimmungen, die sich z. B. in einem ähnlichen Verhalten in biologischen Versuchen äussern.

Gegenüber den Thiophenderivaten sind die Verbindungen des Furans leichter zugänglich, so dass es uns interessant erschien, vergleichende Untersuchungen mit solchen Furanverbindungen vorzunehmen, zu denen wirksame Isostere in der Benzolreihe bekannt sind. Für solche Vergleiche besonders geeignet erschienen uns isostere Verbindungen aus der Reihe der Aryl-alkyl-amine. Von den bereits vorhandenen zahlreichen Untersuchungen auf diesem Gebiet<sup>1)</sup> seien einige in diesem Zusammenhang erwähnt. So fand *Barger*<sup>2)</sup>, dass Thienyl-äthylamin in seinen Eigenschaften und Wirkungen besonders auch im biologischen Versuch mit Phenyl-äthylamin quantitativ

<sup>1)</sup> Siehe *M. Guggenheim*, „Die biogenen Amine“, 1940.

<sup>2)</sup> Soc. 1938, 2100.