

QUELQUES MODÈLES SIMPLES POUR L'ÉTUDE DE L'HYDROLYSE PROTÉIQUE EN MILIEU FAIBLEMENT ACIDE

par

P. DESNUELLE ET G. BONJOUR

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

Etudiant récemment sur papier les aminoacides libérés pendant l'hydrolyse oxalique des protéines, PARTRIDGE¹ a constaté que la tache correspondant à l'acide aspartique apparaît dans la plupart des cas bien avant celles de l'acide glutamique et des autres aminoacides. Cette expulsion apparemment préférentielle de l'acide aspartique n'est d'ailleurs pas réservée aux seules hydrolyses oxaliques. On l'observe également avec d'autres acides faibles comme l'acide acétique¹ et même avec l'acide chlorhydrique 0.1 N². Elle semble donc représenter un caractère fondamental de l'hydrolyse protéique en milieu faiblement acide. D'après PARTRIDGE, un tel milieu permettrait aux β -carboxyles aspartiques (éventuellement débarrassés au préalable de leurs liaisons amides) d'être en partie dissociés et de fournir par conséquent les protons nécessaires à l'hydrolyse des liaisons voisines. Cette interprétation séduisante mérite d'être brièvement discutée.

a. Pourquoi l'acide glutamique, dont le résidu possède aussi un carboxyle latéral, n'est-il vu sur le papier qu'après l'acide aspartique? Deux éventualités se présentent ici: Ou bien l'acide glutamique est effectivement libéré mais il n'est pas vu parce qu'il se cyclise aussitôt en acide pyrrolidone-carboxylique³. Ou bien, le γ -carboxyle glutamique, par suite de son pK plus élevé⁴ ou (et) par suite de sa plus grande distance, est un donateur de protons moins efficace que le β -carboxyle aspartique.

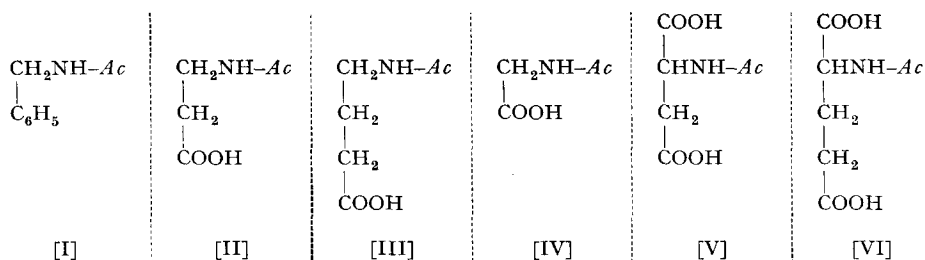
b. D'autre part, si l'argumentation de PARTRIDGE est valable, on pourrait s'attendre à ce que les résidus C-terminaux, libérés eux-mêmes par leurs α -carboxyles¹, engendrent des aminoacides "quelconques". Mais, s'ils sont "quelconques", les aminoacides en question doivent apparaître individuellement en si faibles quantités que leurs taches ne sont pas décelables pendant les premières heures du traitement. En outre l' α -carboxyle terminal peut, pour des raisons analogues aux précédentes, être moins efficace que le β -carboxyle latéral des résidus aspartiques.

Une autre interprétation du même phénomène a d'ailleurs été proposée par BLACKBURN². D'après cet auteur, la source locale de protons serait, non pas le β -carboxyle partiellement dissocié, mais le cation amide du résidu asparagine. La faible acidité des milieux d'hydrolyse favoriserait la libération de l'acide aspartique en prolongeant simplement l'existence de l'amide.

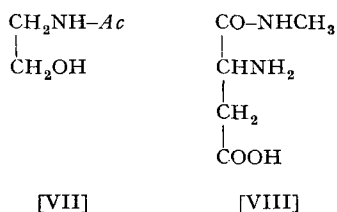
Quoi qu'il en soit, cette expulsion préférentielle de l'acide aspartique présente un grand intérêt théorique et pratique³. Nous en avons pleinement confirmé l'existence et, au cours du présent travail, nous en étudions l'origine sur des modèles simples. Dans la plupart de ces modèles, la liaison peptidique est uniformément représentée par la

* Cette éventualité n'est d'ailleurs pas très vraisemblable car, d'après nos propres essais effectués avec 1.06 mg d'acide glutamique dans 20 ml d'acide oxalique, on retrouve sur le papier après un chauffage de 7 h la quantité attendue d'acide.

liaison N-acétyle: l'*acétylbenzylamine* [I] ne possède aucun groupement ionique en position latérale. Sa liaison peut donc servir de modèle pour les liaisons peptidiques reliant deux *endorésidus** neutres. Par contre, dans l'acide 3-*acétaminopropionique* [II] et dans l'acide 4-*acétaminobutyrique* [III], la liaison N-acétyle est accompagnée d'un carboxyle en β ou en γ , comme les liaisons peptidiques des *endorésidus* aspartiques et glutamiques. Dans l'acide *acétaminoacétique* [IV], cette liaison est en α d'un carboxyle, comme au niveau des résidus neutres C-terminaux. Dans les acides *acétylaspartique* [V] et *acétylglutamique* [VI], il y a deux carboxyles en α - β et en α - γ de la liaison acétyle. Cette dernière est alors analogue aux liaisons des résidus aspartiques et glutamiques C-terminaux.



On sait d'autre part que les liaisons peptidiques situées du côté aminé des résidus hydroxylés (liaisons sérine et thréonine) manifestent une labilité particulière vis-à-vis des acides forts^{4, 5, 6}. Nous avons donc synthétisé aussi le 2-*acétaminoéthanol* [VII] afin d'étudier l'action exercée au sein des acides faibles par la fonction OH en α et comparer cette action avec celle des carboxyles. Enfin, nous avons préparé la *méthylisoasparagine* [VIII] qui, en plus de son carboxyle, possède une fonction NH_2 libre. Cette dernière substance est un modèle convenable des résidus aspartiques N-terminaux.



PARTIE EXPERIMENTALE

Techniques de synthèse et d'analyse

1. La *méthylisoasparagine* a été préparée en substituant la méthylamine à l'ammoniaque dans la technique décrite par BERGMAN ET ZERVAS⁷ pour l'*isoasparagine*. L'anhydride obtenu à partir de 2.0 g d'acide carbobenzoxyaspartique est immédiatement traité par 32 ml de méthylamine à 15.5 % préalablement refroidie à 0°. Pendant la réaction, le récipient est maintenu dans la glace pour éviter tout échauffement. On acidifie ensuite légèrement par HCl 12 N, on laisse 1 h à la glacière, on essore les cristaux, on les lave abondamment avec de l'eau froide et on les dissout dans le minimum de méthanol. On agite violemment la solution à 50° dans une atmosphère d'hydrogène en présence

* Par analogie avec la nomenclature des enzymes protéolytiques, il semble que l'on pourrait affecter le préfixe *endo* à tous les résidus situés à l'intérieur d'une chaîne peptidique et le préfixe *exo* aux deux résidus situés en positions N-terminale et C-terminale.

d'une quantité substantielle de palladium sur charbon⁸. Vers la fin de la réaction, des cristaux apparaissent. On les redissout en chauffant légèrement, on élimine le catalyseur et on évapore à sec la solution sous pression réduite. On cristallise enfin le résidu dans le méthanol. Rendement: 77 %.

Ce dérivé possède bien la structure *iso* car, traité à l'ébullition par CO_3Cu , il n'engendre, comme l'*iso*asparagine, qu'une coloration bleue très faible. Dans les mêmes conditions et à la même concentration, l'asparagine engendre une intense coloration, grâce à son système aminocarboxyle en α .

2. L'acide γ -aminobutyrique a été synthétisé à partir du triméthylènechlorobromure. Ce dernier est converti en triméthylènechloronitrile, le nitrile est condensé avec le dérivé potassique de la phthalimide et le produit de condensation est décomposé par SO_2H_2 ⁹.

3. *Acétylations*. L'acétylation du 2. aminoéthanol a été réalisée en chauffant des quantités équimolaires de l'aminoalcool et d'acide acétique glacial¹⁰. Le dérivé acétylé distille entre 190 et 192° sous 25 m/m (et non à 195° sous 10 m/m comme il est indiqué¹⁰). Les autres dérivés acétylés ont été préparés par action de l'anhydride acétique sur les produits eux-mêmes¹¹ ou sur leurs sels alcalins¹². Quand les dérivés n'ont pas cristallisé spontanément, ils ont été extraits en milieu acide par l'acétate d'éthyle ou l'éther. Les extraits ont été lavés avec le minimum d'eau puis évaporés. Les résidus, généralement cristallins, ont été maintenus dans un exsiccateur en présence de potasse afin d'éliminer les traces d'acide acétique qu'ils contenaient encore. La pureté de tous ces dérivés a été vérifiée par des dosages d'azote. On trouvera dans le Tableau I les résultats des dosages.

TABLEAU I
TENEUR EN AZOTE (%) DES DÉRIVÉS

Les numéros I₁, II₁, etc. . . désignent les dérivés acétylés des substances auxquelles nous avons précédemment attribué les numéros I, II, etc. . . Tous ces dérivés ont été pris dans un état rigoureusement anhydre.

	I ₁	II ₁	III ₁	IV ₁	V ₁	VI ₁	VII ₁	VIII
Calculé	9.4	10.7	9.6	11.9	8.0	7.4	13.6	19.2
N (%) — Trouvé	9.3	10.5	9.3	12.0	7.6	7.5	13.6	18.8

Notons en outre que tous ces dérivés sont ninhydrine-négatifs, sauf l'acide acétaminoacétique (acétylglycine) qui, même rigoureusement pur, se colore faiblement dans les conditions ordinaires de la révélation sur papier (3 min à 85°).

4. *Hydrolyses oxaliques*. 30 mg de chaque dérivé sont dissous dans 3 ml d'acide oxalique 0.25 M, les solutions sont placées dans un thermostat à 105° et, après des temps variables, des échantillons sont prélevés. Ces échantillons sont neutralisés à pH = 4.0 par de la baryte, l'oxalate de baryum est lavé et les liquides sont évaporés sous vide à 35°. Chaque résidu est repris dans 1 ml d'eau et quelques μl de cette dernière solution sont appliqués sur une feuille de papier Whatman n° 1 à l'aide d'une microseringue *Agl*a. Sur la même feuille, on applique aussi des quantités régulièrement croissantes du produit non-acétylé correspondant**, afin d'obtenir ultérieurement une échelle de référence. On effectue un chromatogramme unidimensionnel phénol-NH₃ (butanol-acide formique dans le cas de l'acétylbenzylamine). La quantité de produit hydrolysé (et, par conséquent, le degré d'hydrolyse) est enfin évaluée en comparant l'aire des taches avec celle des taches de référence¹³.

* Dans ces conditions, les pertes en 2. aminoéthanol et en benzylamine, dues à un éventuel entraînement à la vapeur sont négligeables.

** La benzylamine donne avec la ninhydrine une tache marron qui vire ultérieurement au violet intense quand la feuille de papier est laissée quelques heures à la température ordinaire.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble de ces opérations nous a permis de mesurer la vitesse avec laquelle les dérivés précédents s'hydrolysent au sein de l'acide oxalique. Les courbes de la Fig. 1 indiquent les résultats obtenus.

Ces courbes montrent que:

1. La liaison N-acétyle s'hydrolyse plus vite dans les molécules carboxyliques que dans l'acétalbenzylamine dépourvue de groupes COOH. Cet effet, qui n'est pas attribuable à l'acide acétique libéré pendant le traitement*, est dû sans aucun doute à la présence de carboxyles dans les molécules étudiées.

2. L'efficacité de ces carboxyles varie d'ailleurs suivant les cas. Si l'on considère tout d'abord les molécules monocarboxyliques, on constate que le β -carboxyle de l'acide 3-acétaminopropionique est le plus actif. Puis, par ordre d'efficacité décroissante, viennent l' α -carboxyle de l'acide acétaminoacétique et le γ -carboxyle de l'acide 4-acétaminobutyrique. Ce dernier n'exerce d'ailleurs qu'une influence presque négligeable.

3. Les constatations faites avec les molécules dicarboxyliques ne sont pas moins intéressantes et elles confirment les résultats précédents. D'une part, les acides acétylaspartique et acétylglutamique s'hydrolysent notablement plus vite que le dérivé monocarboxylique le plus sensible (acide 3-acétaminopropionique). D'autre part, le β -carboxyle se révèle là encore plus efficace que le γ (voir respectivement les courbes relatives à l'acide acétylaspartique et à l'acide acétylglutamique).

Les trois remarques précédentes sont en très bon accord avec les observations faites par PARTRIDGE pendant l'hydrolyse

oxalique des protéines et aussi avec l'interprétation que propose cet auteur. Elles montrent en effet que les carboxyles latéraux sont parfaitement capables d'accélérer en milieu faiblement acide l'hydrolyse des liaisons peptidiques voisines. Elles suggèrent également, si les chaînes peptidiques se comportent comme nos modèles simples, que la libération des divers résidus doit en principe se faire dans l'ordre suivant: résidus aspartiques C-terminaux; résidus glutamiques C-terminaux; *endorésidus* aspartiques; résidus neutres C-terminaux; *endorésidus* glutamiques et neutres. Or, tenant compte du fait que le nombre initial des résidus glutamiques C-terminaux est généralement nul

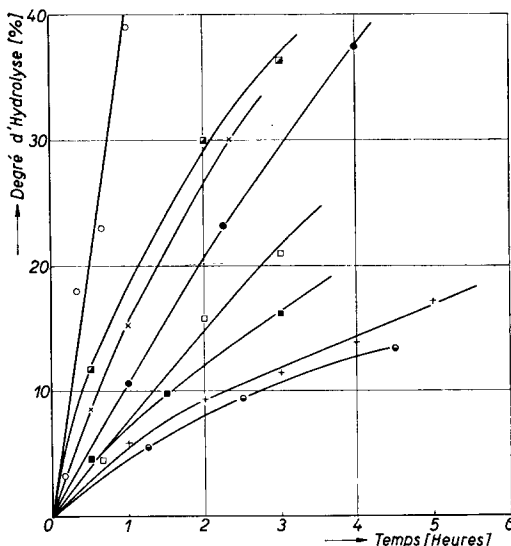


Fig. 1. Hydrolyse oxalique des dérivés acétylés et de la méthylisoasparagine. ●: Acétylbenzylamine; □: Acide 3-acétaminopropionique; +: Acide 4-acétaminobutyrique; ■: Acide acétaminoacétique; O: Acide acétylaspartique; x: Acide acétylglutamique; ●: 2. Acétaminoéthanol; ◻: Méthylisoasparagine

* Car il se manifeste dès les premières minutes. En outre, la quantité d'ions H^+ susceptibles d'être apportés par l'acide acétique est peu importante par rapport à la quantité initiale fournie par l'acide oxalique.

ou très faible, c'est là l'ordre même qui paraît s'établir pendant l'hydrolyse protéique*.

4. Le cas du 2-acétaminoéthanol mérite un examen particulier car le groupe labilisateur est ici, non plus un carboxyle, mais un hydroxyle. La Fig. 1 nous apprend que cet hydroxyle est doué d'une activité supérieure à celle du carboxyle le plus efficace. Nous retrouvons donc au sein des acides faibles cette labilisation des liaisons N-acyles par les hydroxyles en α , déjà constatée sur la N-benzoylsérine au sein des acides forts et concentrés⁶. On ne s'étonnera d'ailleurs pas, malgré la position des courbes de la Fig. 1, de ne trouver ni sérine ni thréonine libres dans les hydrolysats oxaliques des protéines. La fonction OH en effet ne labilise que les liaisons situées du côté aminé des résidus hydroxylés. Le comportement du 2-acétaminoéthanol suggère donc tout au plus que les acides faibles sont peut-être capables, comme les acides forts, de rompre préférentiellement les liaisons sérine et thréonine** et, par conséquent, d'engendrer des séryl et des thréonylpeptides***.

5. Dans la méthylisoasparagine enfin, le radical hydrolysable n'est plus un radical N-acétyle. Le comportement de cette molécule n'est donc pas strictement comparable à celui des molécules précédentes. Notons néanmoins que la méthylisoasparagine est sensiblement plus stable en milieu oxalique que l'acide acétylaspartique. Les résidus aspartiques N-terminaux, (stabilisés dans une certaine mesure par leur fonction NH_2) sont donc vraisemblablement hydrolysés moins vite que les résidus aspartiques C-terminaux (dont la liaison subit au contraire l'action combinée de deux carboxyles). Si cette interprétation est exacte, les hydrolysats oxaliques contiendraient plus d'aspartylpeptides que de peptides aspartiques.

RÉSUMÉ

1. Les molécules N-acétylées portant un carboxyle libre (ou, mieux encore, deux carboxyles) s'hydrolysent plus vite au sein de l'acide oxalique 0.25 *M* que les molécules N-acétylées non-carboxyliques. L'efficacité des carboxyles varie suivant leur position ($\beta > \alpha > \gamma$). Tous ces faits confirment la façon dont PARTRIDGE interprète la libération préférentielle de l'acide aspartique pendant l'hydrolyse des protéines en milieu faiblement acide.

2. Une fonction OH en α exerce sur la liaison N-acétyle un effet labilisateur plus important que le carboxyle le plus efficace. Il est donc possible que, dès le début du traitement, les hydrolysats oxaliques contiennent des séryl et des thréonylpeptides.

3. La méthylisoasparagine est plus stable en milieu oxalique que l'acide acétylaspartique. Les hydrolysats oxaliques contiennent donc vraisemblablement plus d'aspartylpeptides que de peptides aspartiques.

SUMMARY

1. N-acetylated molecules with a free carboxyl (or, better still, two carboxyls) are hydrolysed more quickly by 0.25 *M* oxalic acid than the non-carboxylic N-acetylated molecules. The efficiency of the carboxyls varies according to their position ($\beta > \alpha > \gamma$). All these facts confirm the way

* Nous ne discuterons d'ailleurs pas au cours du présent travail la cause de l'efficacité si particulière des β -carboxyles.

** Nous avons déjà appelé dans un précédent travail¹⁴ liaison *sérine* toute liaison située du côté NH des résidus sérine et *séryle* toute liaison située du côté CO de ces mêmes résidus¹⁴. Nous proposons en outre d'appeler sérylpeptide ou sérinepeptide (par exemple), tout peptide possédant un résidu sérine, respectivement, en position N ou C-terminale. Cette proposition est d'ailleurs en accord avec la nomenclature classique des peptides.

*** Dans ce cas, l'hydrolyse en milieu faiblement acide serait moins spécifique que le travail de PARTRIDGE le fait croire. Notons toutefois que les α -acylaminoalcools simples ne se comportent pas toujours comme les résidus hydroxylés des protéines¹⁵. Un contrôle expérimental direct, dont nous comptons publier bientôt les résultats, est donc nécessaire.

in which PARTRIDGE interprets the preferential liberation of aspartic acid during the protein hydrolysis in a weakly acid medium.

2. An OH in α exerts on the N-acetyl bond a labilizing effect more important than the most efficient carboxyl. It is therefore possible that, at the beginning of the treatment, the oxalic hydrolysates contain some seryl and some threonyl peptides.

3. Methylisoasparagine is more stable in oxalic medium than acetylaspartic acid. Oxalic hydrolysates probably contain more aspartyl peptides than aspartic peptides.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die N-acetylierten Moleküle, welche eine (oder besser zwei) freie Carboxylgruppen enthalten, werden in 0.25 M Oxalsäure leichter hydrolysiert als diejenigen, welche keine Carboxylgruppen enthalten. Die Wirksamkeit der Carboxylgruppen variiert je nach ihrer Stellung ($\beta > \alpha > \gamma$). All diese Tatsachen bestätigen PARTRIDGE's Interpretation der bevorzugten Freimachung von Asparaginsäure während der Hydrolyse der Proteine in schwach saurer Lösung.

2. Eine α -ständige OH-Gruppe macht die N-Acetyl-Bindung noch labiler als die wirksamste Carboxylgruppe dies tut. Es ist also möglich, dass vom Beginn der Behandlung an, die Oxalsäure-Hydrolysate Seryl- und Threonyl-Peptide enthalten.

3. Methyl-isoasparagin ist in Oxalsaurer Lösung stabiler als Acetylasparaginsäure. Die Oxalsäure-Hydrolysate enthalten also wahrscheinlich mehr Asparagylpeptide als Asparaginsäure-Peptide.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ S. M. PARTRIDGE ET H. F. DAVIS, *Nature*, 165 (1950) 62.
- ² S. BLACKBURN, *Biochem. J.*, 47 (1950) xxviii.
- ³ G. S. ADAIR, H. F. DAVIS ET S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 167 (1951) 605.
- ⁴ A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1369.
- ⁵ P. DESNUELLE ET A. CASAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 64.
- ⁶ P. DESNUELLE, M. ROVERY ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 134.
- ⁷ M. BERGMANN ET L. ZERVAS, *Ber.*, 65 (1932) 1192.
- ⁸ R. WILLSTÄTTER, *Ber.*, 54 (1921) 128.
- ⁹ C. C. DE WITT, *Org. Syntheses*, Coll. Vol. II, p. 25.
- ¹⁰ H. WENKER, *J. Am. Chem. Soc.*, 57 (1935) 1079.
- ¹¹ R. M. HERBST ET D. SHEMAIN, *Org. Syntheses*, Coll. Vol. II, p. 11.
- ¹² B. H. NICOLET, *J. Am. Chem. Soc.*, 52 (1930) 1192.
- ¹³ R. B. FISHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
- ¹⁴ M. ROVERY, P. DESNUELLE ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 166.
- ¹⁵ P. DESNUELLE ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 451.

Reçu le 17 Janvier 1952