

SCIENCE ET PÊCHE

BULLETIN D'INFORMATION ET DE DOCUMENTATION
DE

L'INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DES PÊCHES MARITIMES

59, Avenue Raymond - Poincaré, PARIS (16^e)

N° 88

PUBLICATION MENSUELLE

DECEMBRE 1960

LES PROTEINES, LEUR HYDROLYSE, LES PROTEASES

par Maurice BOURY

Bien qu'il s'agisse d'un simple exposé de notions élémentaires concernant la structure chimique des protéines et le résultat de leur scission sous l'action d'agents chimiques ou de catalyseurs d'origine biologique, nous pensons que la publication de cet article dans un bulletin de documentation pratique pourra rendre service à différents lecteurs. Aux uns, elle donnera un aperçu sur des questions fondamentales de chimie physiologique dont la connaissance permet de mieux saisir certains problèmes biologiques ; aux autres, particulièrement aux industriels, elle fournira la première base d'une étude technique des diverses transformations et utilisations possibles du poisson.

LES PROTEINES

Suivant une nomenclature habituellement adoptée, les protéines sont les principes azotés qui forment des constituants essentiels et caractéristiques de la matière vivante, elles possèdent une structure très complexe et un poids moléculaire élevé ; elles sont douées de propriétés spécifiques. Ces corps sont aussi dénommés "protéides", "substances protéiques" ou "matières albuminoïdes". Comme leurs molécules renferment toujours en proportion notable du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote, on leur a donné la désignation de "principes quaternaires" afin de marquer leur différence fondamentale avec les hydrates de carbone et les corps gras, dans la composition élémentaire desquels entrent seulement, d'une façon constante, le carbone, l'hydrogène et l'oxygène ; ces dernières substances constituent les "principes ternaires". Les hydrates de carbone (sucres, amidon, glycogène, cellulose) répondent aujourd'hui à l'appellation de glucides, tandis que les corps gras forment le groupe des lipides.

Cependant, la classification en principes quaternaires ou ternaires est devenue désuète. On doit remarquer en effet que les protéines renferment souvent d'autres éléments que les quatre précités: le soufre est presque toujours présent en proportion plus ou moins notable; le phosphore est assez fréquent. La molécule protéique peut encore contenir, en faible dose, des métalloïdes ou des métaux divers, notamment de l'iode, du fer, du cuivre, du magnésium.

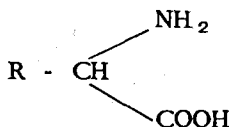
D'autre part, un corps peut contenir du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote sans être pour autant une protéine: tel est le cas de l'urée. Ne sont des protéines que les composés organiques azotés capables de donner des acides aminés par hydrolyse, c'est-à-dire sous l'effet d'une réaction déterminée par les ions H et OH de l'eau et provoquant la scission de la molécule.

Les acides aminés (ou aminoacides) sont des corps qui possèdent à la fois dans leur molécule au moins une fonction acide carboxylique (-CO OH) et une fonction amine primaire (-NH₂). Par exception cependant, les deux aminoacides dénommés proline et hydroxyproline ne contiennent pas la fonction amine primaire mais présentent un groupe amine secondaire faisant partie d'un hétérocycle.

L'acide aminé le plus simple est le glycolle (ou glycine) de formule $\text{CH}_2 - \text{CO OH}$.



La formule générale des acides aminés est représentée par le schéma ci-dessous dans lequel le groupe R varie d'un acide aminé à l'autre et confère à chacun une propriété biologique spéciale.



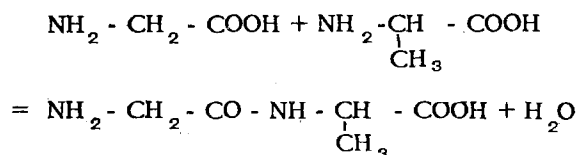
Le nombre total des aminoacides bien caractérisés n'excède pas la trentaine; plusieurs d'entre eux ont été reconnus comme absolument indispensables à la croissance et à l'entretien de l'organisme humain. D'après les recherches récentes, il est actuellement reconnu neuf acides aminés indispensables dont voici l'énumération:

valine; leucine; isoleucine; thréonine; méthionine (renferme du soufre); lysine; phénylalanine; tryptophane; histidine.

Selon leur origine, les différentes protéines peuvent fournir des mélanges d'acides aminés de richesse et de composition très variables. Il est à noter que les protéines du poisson sont capables d'apporter à la ration alimentaire les aminoacides indispensables.

Les peptides désignent les produits naturels ou synthétiques qui résultent de l'union de deux ou plusieurs molécules d'acides aminés identiques ou différents. La soudure s'effectue entre la fonction amine d'une molécule et le carboxyle de la molécule suivante; elle se traduit par la formation d'une fonction amide avec perte d'une molécule d'eau. Cette liaison (-CO-NH-) est dite peptidique. Selon le nombre de molécules génératrices, on distingue les di-, tri-, ... polypeptides.

A titre d'exemple, voici l'une des deux combinaisons que donne l'enchaînement du glycolle et de l'alanine:



Les polypeptides peuvent provenir de la désintégration ménagée des protéines ou être édifiés artificiellement par synthèse; ils constituent des produits intermédiaires entre les acides aminés et les protéines.

Les protéines comprennent deux groupes principaux :

- 1 - Les protéines simples (ou holoprotéines) ne donnent à l'hydrolyse que des aminoacides;
- 2 - Les protéines conjuguées (ou hétéroprotéines ou protéïdes) fournissent des acides aminés et des corps de nature totalement différente dérivant d'une substance appelée "groupement prosthétique".

Bien que nous adoptions ici cette nomenclature comme étant la plus courante, nous devons mentionner qu'une terminologie différente a été proposée par des biochimistes français (M. Javillier, 1943). Ceux-ci appellent protéïdes l'ensemble des protéines simples ou conjuguées et réservent le vocable "protéine" aux substances ne contenant pas de groupement prosthétique. Les deux groupes considérés ci-dessus sont alors respectivement dénommés: holoprotéïdes et hétéroprotéïdes.

Parmi les **protéines simples** nous citerons :

- **Les protamines** : on les considère comme les protéines les plus simples; elles sont nettement alcalines, solubles dans l'eau et incoagulables par la chaleur; on les rencontre dans les laitances de poisson.
- **Les histonines** (ou histones), solubles dans l'eau, coagulables par la chaleur mais seulement en présence de sels neutres, constituent un groupe intermédiaire entre les protamines et les albumines; leur présence est constatée dans les glandes et produits génitaux males, notamment chez les poissons.
- **Les albumines**, solubles dans l'eau et les solutions salines diluées, ont une réaction neutre ou faiblement acide; en présence d'une petite quantité de sels minéraux, la chaleur les coagule entre 70 et 90°C; elles sont très répandues dans les différents tissus (muscle, sérum, blanc d'œuf, etc...).
- **Les globulines** sont insolubles dans l'eau pure et les solutions salines concentrées, mais solubles dans les solutions étendues de sels neutres; elles coagulent à la chaleur; leur réaction est acide. De même que les albumines, elles sont abondamment rencontrées dans les matières d'origine biologique.
- **Les scléroprotéines** (ou albumoïdes) forment un groupe hétérogène constitué par diverses substances ayant des fonctions de soutien ou de protection. En générale elles se caractérisent par leur teneur élevée en glycoColle et leur résistance aux agents d'hydrolyse; certaines d'entre elles cependant subissent aisément une transformation par simple chauffage dans l'eau.

Parmi les scléroprotéines, citons : les collagènes de la peau, des tendons, des tissus cartilagineux et osseux; la spongine des éponges; les kératines des productions cornées. Ces dernières sont particulièrement résistantes aux agents digestifs; elles figurent notamment dans les écailles des poissons et les fanons de la baleine.

Les collagènes se transforment en gélatine et en colle par chauffage dans l'eau à l'autoclave. La transformation des collagènes en gélatine consiste essentiellement dans une hydratation mais non dans une véritable hydrolyse. Cependant l'eau à température élevée provoque une hydrolyse partielle en même temps que l'hydratation et la solubilisation. Il importe que la matière soit convenablement traitée afin d'éviter une dégradation notable qui se traduirait par la disparition du pouvoir gélifiant, caractéristique de la gélatine de bonne qualité.

Les gélatines ne possèdent qu'une valeur alimentaire réduite car elles sont dépourvues de certains aminoacides importants pour la nutrition (tryptophane, tyrosine).

Parmi les colles et gélatines spéciales mentionnons l'ichthyocolle. Le produit le plus estimé par sa pureté et sa qualité est fabriqué avec la vessie natatoire de l'esturgeon; mais il existe des imitations préparées avec la vessie natatoire d'autres espèces ou même avec des matières d'origine très différente.

Les protéines conjuguées comprennent :

- **Les phosphoprotéides** chez lesquels le groupement prosthétique est de nature phosphorique; ils se comportent comme des acides et sont insolubles dans l'eau. On les rencontre dans le jaune d'œuf (vitelline) et le lait (caséine).

- **Les nucléoprotéides**: ce sont des constituants des noyaux cellulaires auxquels ils confèrent une réaction acide. Ils résultent de la combinaison de protéines plus ou moins basiques avec des acides nucléiques (ou nucléiniques) qui forment les groupements prosthétiques. Ceux-ci peuvent être décomposés en: acide phosphorique, pentose, base purique ou pyrimidique.

Les nucléines sont constituées par des combinaisons d'acides nucléiques avec des histones ou des protamines.

Les laitances de hareng sont particulièrement riches en acides nucléiques.

- **Les chromoprotéides**: ces protéides sont colorés et leur groupement prosthétique renferme généralement du fer, du cuivre ou autre métal. Ils constituent notamment les pigments respiratoires (hémoglobine des vertébrés; hémocyanine des mollusques et crustacés).

- **Les glucoprotéides** (ou mucoprotéides): ces corps renferment un glucide ou un dérivé azoté d'un sucre en proportion souvent importante. On les trouve par exemple dans le mucus et les cartilages; ils peuvent donner, dans l'eau ou les alcalis étendus, des solutions filantes et mousseuses.

Les différentes substances que nous venons d'énumérer, c'est-à-dire les acides aminés, les polypeptides, les protéines simples ou conjuguées, se trouvent englobées dans le terme général: *protide*. Par contre, les groupements prosthétiques, libérés des protéides par hydrolyse, ne sont pas de nature protidique. En somme, les protides comprennent les acides aminés et toutes les substances qui peuvent en engendrer par hydrolyse. Avec les lipides et les glucides, ils forment les trois grandes catégories de principes énergétiques dont la présence apporte dans la ration alimentaire les calories indispensables au fonctionnement de l'organisme. En plus de l'apport d'énergie, les aliments azotés fournissent des matériaux fondamentaux pour l'édification, la croissance et la réparation des tissus vivants; ils remplissent donc un rôle plastique.

LES PRODUITS DE DEGRADATION DES PROTEINES

Les anciens biochimistes accordaient beaucoup d'attention aux produits résultant de la digestion progressive des protéines. En particulier, ils se sont efforcés d'établir, d'après le degré de dégradation, une classification des produits obtenus. Ceux-ci ont été répartis en deux groupes principaux: les albumoses et les peptones. En outre, des subdivisions ont été créées à l'aide de procédés de précipitations fractionnées et de caractères de solubilité.

- **Les albumoses** correspondent au premier stade de la désintégration; elles ne sont pas coagulables par la chaleur, à la différence de la quasi-totalité des protéines, mais sont précipitées de leurs solutions par le sulfate d'ammonium à saturation.

- **Les peptones** vraies désignent des produits assez fortement dégradés; elles ne sont pas précipitées de leur solution par le sulfate d'ammonium.

De même que les protéines, les albumoses et les peptones donnent la réaction colorée du biuret (soude plus sulfate de cuivre), tandis que les derniers produits obtenus par l'hydrolyse (c'est-à-dire les acides aminés) ne fournissent pas cette réaction. Celle-ci est attribuée aux liaisons peptidiques; elle permet de caractériser les protéines et leurs dérivés polypeptidiques.

Aujourd'hui, on n'attache qu'un intérêt réduit aux anciennes classifications basées sur la précipitation ou la solubilité, car elles sont très artificielles et sans rapport avec la grandeur de la masse moléculaire des substances étudiées. En fait, les albumoses et les peptones ne sont que des mélanges complexes, non chimiquement définis. L'application de procédés de précipitation aux produits issus des protéines peut constituer un moyen commode de repérage du degré de dégradation; mais il ne saurait être question d'isoler de cette façon des corps de constitution bien déterminée.

On convient maintenant de désigner sous l'expression générale de *protéoses* tous les produits non définis chimiquement, solubles dans l'eau (ou les solutions salines neutres très étendues) et incoagulables par la chaleur, issus d'une transformation hydrolytique des protéines et représentant des termes de transition entre les protéines naturelles et les acides aminés (Morel, 1942).

Les protéoses sont constituées par des mélanges riches en polypeptides; elles comprennent les produits précédemment désignés sous les noms d'albumoses et de peptones. Signalons cependant que le terme "protéose" a été utilisé autrefois comme synonyme d'albumose.

D'autre part, le vocable "peptone" est toujours d'un usage courant; mais, dans la pratique, il désigne des produits commerciaux répondant en fait à la définition des protéoses. Les peptones du commerce sont en effet des mélanges complexes contenant, en proportions respectivement très variables, les différents produits plus ou moins dégradés provenant de matières protéiques diverses.

L'HYDROLYSE

Nous avons donné précédemment la définition concise de l'hydrolyse et indiqué que celle-ci se traduit par la formation, à partir des protéines, de produits de plus en plus simples: polypeptides constitués par un nombre décroissant d'acides aminés et enfin acides aminés libres. Pour les protéides, la libération des acides aminés est accompagnée de celle des constituants des groupements prosthétiques (acide nucléique par exemple).

Nous allons maintenant formuler quelques observations générales au sujet des conditions dans lesquelles l'hydrolyse peut s'effectuer.

Lorsque de la chair est soumise à un chauffage prolongé en milieu aqueux, la coagulation, qui s'est produite dès le début du chauffage, est suivie d'un ramolissement progressif. Celui-ci est imputable à un commencement d'hydrolyse des protéines avec formation de produits moins compliqués qui ont tendance à entrer en solution colloïdale.

Cependant, pour que l'hydrolyse donne des résultats appréciables dans un laps de temps limité, il convient de faire intervenir un catalyseur; celui-ci peut être de nature chimique ou d'origine biologique. Selon le catalyseur mis en œuvre et les conditions de la réaction, la désintégration peut être plus ou moins rapide et complète. Dans tous les cas, l'hydrolyse des protéines et des polypeptides se traduit par la rupture de liaisons peptidiques.

L'HYDROLYSE CHIMIQUE

L'hydrolyse chimique se fait avec des acides ou des bases. Les produits qui se forment au début de la réaction ont été appelés soit acidalbumines (ou syntonines), soit alcalalbumines, mais il ne s'agit en réalité que de substances non définies chimiquement. Lorsque l'hydrolyse est achevée, les acides aminés sont totalement libérés; toutefois, les réactions chimiques ne se limitent pas à la scission de la molécule protéique en ses aminoacides constituants. Les bases en particulier présentent l'inconvénient de provoquer la destruction d'une forte proportion d'acides aminés (désamination).

Pour réaliser au laboratoire l'hydrolyse complète des protéines, on fait généralement bouillir celles-ci pendant plusieurs heures soit avec de l'acide sulfurique à 25%, soit avec de l'acide chlorhydrique ou de l'acide fluorhydrique. Bien que les acides soient moins destructeurs que les bases, ils décomposent cependant une partie des acides aminés avec production d'ammoniac. Certains acides aminés, principalement le tryptophane, sont particulièrement sujets à la destruction durant l'hydrolyse acide.

L'hydrolyse peut aussi provoquer la formation de substances mal définies, dites "humiques", par suite de réactions secondaires entre les aminoacides libérés et des glucides.

Il est possible de rendre l'hydrolyse chimique moins brutale et moins complète en modérant la température ou en réduisant la concentration en acide ou en base; on peut alors recueillir les produits intermédiaires de la dégradation protéique, c'est-à-dire des polypeptides.

L'HYDROLYSE BIOCHIMIQUE

Caractères des catalyseurs biochimiques.- Les catalyseurs élaborés par la matière vivante portent, d'une façon générale, le nom de *ferments solubles*, *diastases* ou *enzymes*; ceux qui accélèrent des réactions hydrolytiques sont appelés *hydrolases*.

Il existe de nombreux ferments dont l'activité s'exerce sur des matières différentes et dans des conditions diverses. Les diastases qui nous intéressent ici forment le groupe des *protéases*; leur rôle est de provoquer la rupture de liaisons peptidiques.

Les protéases sont divisées en deux sous-groupes: les *protéinases* (ou *protéidases*) et les *peptidases* (ou *épeptases*). Les premières sont capables d'attaquer les protéines auxquelles elles font subir un clivage plus ou moins poussé mais sans aller jusqu'à la libération complète de tous

les acides aminés; les secondes, sans action sur les protéines, peuvent seulement agir sur les polypeptides qu'elles transforment en acides aminés. Comme protéinases, citons la pepsine du suc gastrique et la trypsine obtenue à partir du pancréas. Les peptidases sont notamment fournies par la muqueuse intestinale des animaux supérieurs; elles sont communément groupées sous le nom d'érepsine.

Il importe de remarquer que les sucs sécrétés par les divers organes digestifs sont généralement des mélanges de plusieurs enzymes distincts ayant chacun des propriétés particulières et un rayon d'action limité; c'est ainsi que l'on trouve des peptidases dans l'extrait de pancréas, à côté de la trypsine proprement dite.

Tels qu'ils se forment dans les tissus organiques, les produits diastatiques peuvent être dépourvus de pouvoir digestif: on dit alors qu'il s'agit de prodiastases; celles-ci deviennent actives après addition d'une substance chimique ou d'un autre ferment (coferment).- Exemple: transformation de la pepsinogène en pepsine par l'acide chlorhydrique dilué et de la trypsinogène en trypsine par l'entérokinase.

La pepsine est capable d'attaquer les protéines naturelles, de décoaguler et solubiliser celles qui ont subi l'action de la chaleur; mais son travail se limite à la dislocation de la molécule protéique en fragments comprenant toujours plusieurs acides aminés. La pepsine sépare le groupement prosthétique des protéides d'avec la partie protidique qui est peptonisée. Elle est sans action sur la spongine ou les protamines ainsi que sur plusieurs glucoprotéides.

La trypsine peut attaquer différentes protéines ainsi que certaines protéoses qui résultent du travail pepsique. Elle est donc apte à pousser la dislocation plus loin que la pepsine; toutefois il existe des groupements peptidiques qui résistent à son action. La trypsine est incapable de réaliser la séparation de tous les acides aminés; certains aminoacides seulement, (principalement la tyrosine), peuvent être détachés de la molécule protéique plus ou moins rapidement. Il appartient à l'érepsine de compléter l'action de la pepsine et de la trypsine et de libérer les divers acides aminés encore enchaînés dans les polypeptides.

Indépendamment des ferments sécrétés par le tube digestif et ses glandes annexes, il existe dans les différentes parties de l'organisme des diastases endocellulaires. Celles-ci sont incluses dans les tissus et liées au protoplasme; elles ne peuvent généralement diffuser à l'extérieur qu'après la mort de la cellule. Chez l'animal vivant, elles assurent les transformations intracellulaires des substances protidiques; chez le mort, elles président au développement des phénomènes d'autolyse, c'est-à-dire d'auto-digestion des tissus abandonnés à eux-mêmes mais protégés contre la putréfaction microbienne (1). Il ressort de la nature des produits formés au cours de cette dégradation que les diastases tissulaires comprennent des protéinases et des peptidases. Toutefois, l'autolyse est plus ou moins rapide selon le tissu; son intensité est surtout manifeste chez certains organes (foie, rein par exemple); par contre, les protéases endocellulaires des muscles paraissent peu actives.

Conditions de l'hydrolyse diastatique. - Vis à vis d'une substance donnée, l'activité d'une diastase dépend principalement de la température et de la réaction alcaline ou acide du milieu. Dans les digestions in vitro, il convient donc de régler les deux facteurs précités en vue d'obtenir les résultats souhaités.

(1) Il est entendu que, dans la présente étude, nous envisageons seulement les transformations qui se développent après la mort, mais non les phénomènes de désassimilation ou de dégénérescence qui peuvent se manifester chez l'organisme vivant.

D'une façon générale, une élévation modérée de la température accélère sensiblement les phénomènes diastasiques. Toutefois, il faut tenir compte de ce que la température de destruction du ferment est voisine de celle qui exalte au maximum le pouvoir hydrolysant. A une température proche du maximum, la diastase agira très énergiquement au début, mais bientôt son activité diminuera sensiblement par suite de son altération progressive. La température la plus convenable dépend donc de la durée de la digestion; cette durée est elle-même fonction du degré de la désintégration que l'on cherche à réaliser. Si l'on veut poursuivre le travail de la diastase le plus loin possible et maintenir entière l'activité de celle-ci pendant un laps de temps assez long, il pourra être préférable d'opérer à une température inférieure de plusieurs degrés à celle où la réaction est la plus rapide. Une température voisine de 40°C peut généralement être considérée comme convenable.

En ce qui concerne le degré d'acidité ou d'alcalinité (ou plus précisément le pH), la valeur optimum varie considérablement d'un enzyme à l'autre. En outre, pour un même ferment, des différences peuvent être constatées selon la constitution de la matière à transformer.

D'une manière générale, les diastases du type pepsine exigent une forte acidité (pH2 environ), tandis que la trypsine et l'érepsine exercent leur action dans un milieu plus ou moins alcalin (pH9 ou 8 environ). Quant aux protéases endocellulaires, elles demandent la neutralité ou une acidité modérée.

Etant donné que des mélanges de diastases se trouvent ordinairement mis en œuvre dans les digestions artificielles, le choix du pH permet de favoriser le ferment dont l'action est recherchée.

Afin d'éviter la corruption bactérienne des matières soumises à la digestion, il est possible de leur ajouter certaines substances (chlorure de sodium, antiseptiques) capables de s'opposer au développement des germes indésirables sans arrêter le travail des diastases.

Comparaison de l'hydrolyse diastasique et de l'hydrolyse chimique. - Ces deux méthodes d'hydrolyse donnent des résultats semblables puisqu'elles fournissent toutes deux les mêmes produits essentiels de la protéolyse: protéoses, polypeptides, acides aminés. En outre, dans la digestion in vitro par les diastases, il se forme de l'ammoniac comme dans l'hydrolyse par les acides ou les bases. La quantité d'ammoniac libéré dépend de la substance attaquée et de l'enzyme; elle est beaucoup plus élevée avec la pepsine qu'avec la trypsine. Cependant, les diastases n'exercent pas sur les aminoacides fragiles l'action destructrice constatée avec les bases et les acides; le tryptophane, en particulier, n'est pas touché. On remarquera en outre que chaque ferment est doué de propriétés spécifiques, ce qui constitue un avantage si l'on désire effectuer une transformation bien déterminée.

D'un autre côté, il convient d'observer que les diastases ne peuvent généralement pas réaliser in vitro une hydrolyse totale, par suite de l'équilibre vers lequel tend la réaction fermentaire. Même lorsque les conditions sont convenables, la vitesse de la transformation ne demeure pas constante; celle-ci est d'abord rapide puis se ralentit du fait de l'action inhibitrice des produits formés. Pour que l'hydrolyse soit complète, il faudrait que les substances résultant de la dégradation protéolytique soient éliminées au fur et à mesure de leur production et que le renouvellement des ferments soit constamment assuré. On remarquera que cette condition est précisément réalisée dans l'organisme, d'où une différence fondamentale entre la digestion artificielle et la digestion naturelle.

Notons enfin que dans l'hydrolyse enzymatique comme dans l'hydrolyse chimique, on peut constater des rétrogradations avec formation de liaisons peptidiques.

Nota. - Le présent exposé a seulement pour objet de rappeler quelques notions fondamentales relatives aux protéides et à leur hydrolyse. Il s'agit d'un domaine de la biochimie singulièrement complexe, où les questions sont encore loin d'être totalement éclaircies. Avec le développement des recherches, il est possible que certaines des classifications et des théories habituellement admises cèdent la place à des conceptions nouvelles.

BIBLIOGRAPHIE

- JAVILLIER (M.), 1943.- Généralités sur la complexité moléculaire des protéides; leurs rôles dans la vie, et leurs applications.- *Conf. Centre perfection. techn.*, (901).
- LINDERSTROM - LANG 1953.- Les phases initiales de la dégradation des protéines par les enzymes.- *Bull. Chim. biol.*, **35**: 100, n° 1-2.
- MOREL 1942.- Les produits de dégradation des protéides.- *Conf. Centre perfection. techn.*, (905).
- RANDOIN (L.), 1949.- L'alimentation des femmes enceintes et des femmes allaitantes. I. Généralités sur le problème de l'alimentation.- *Bull. Soc. sci. alim.*, **37**: 67-76, n° 1-3.

1/11/59