

50346  
1956  
5

N° d'ordre  
21

UNIVERSITÉ DE LILLE - FACULTÉ DES SCIENCES

50376  
1956  
5

# THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

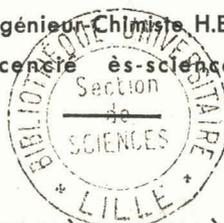
POUR OBTENIR LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

par

**PIERRE PIGACHE**

Ingénieur-Chimiste H.E.I.

Licencié ès-sciences



PREMIÈRE THÈSE

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DE LA KÉRATINE DE LAINE

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le

, devant la Commission d'Examen.

JURY

MM. Jean GERMAIN, *Président.*

BONNEMAN-BEMIA

GLACET

BOULANGER

*Examineurs.*

1956



030 048546 3

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

- Doyen : M. LEFEBVRE, Professeur de Chimie appliquée et Chimie de la Houille
- Assesseur : M. ROUELLE, Professeur de Physique et Electricité Industrielles
- Doyens honoraires : MM. CHATELET  
PRUVOST
- Professeurs honoraires : MM. BEGHIN MM. DEHORNE MM. PARISELLE  
CAU DOLLE PASCAL  
CHAPELLON FLEURY PAUTHENIER  
CHAUDRON LELONG WIEMANN  
CORDONNIER MAZET ZAMANSKY  
DECARRIERE NORMANT
- Professeurs : MM. ARNOULT, Radioélectricité et Electronique  
BONNEMAN-BEMIA, Chimie appliquée  
CORSIN, Paléobotanique  
DECUYPER, Mathématiques générales  
DEHEUVELS, Calcul différentiel et intégral  
Mle DELWAULLE, Chimie P.C.B.  
MM. DUPARQUE, Géologie et minéralogie  
Jean GERMAIN, Chimie générale et Chimie organique  
Paul GERMAIN, Mécanique Rationnelle et Mécanique expérimentale  
HEIM DE BALSAC, Zoologie  
HOCQUETTE, Botanique générale et appliquée  
KAMPE de FERIET, Mécanique des Fluides  
LAMOTTE, Zoologie générale et appliquée  
Mme LELONG, Analyse supérieure et calcul des probabilités  
MM. André MICHEL, chimie minérale  
ROIG, Physique générale  
WATERLOT, Géologie houillère
- Professeurs sans chaire : BONTE, Géologie appliquée  
DEHORS, Physique industrielle  
KOURGANOFF, Astronomie  
PEREZ, Physique P.C.B.  
SAVARD, Chimie générale
- Maîtres de conférences : BROCHARD, Physique  
DEFRETIN, Zoologie  
DELATRE, Géologie  
DESCOMBES, Mathématiques appliquées  
GLACET, Chimie  
LEBEGUE, Chimie agricole et botanique P.C.B.  
MARTINOT LAGARDE, Mécanique des Fluides  
Louis MICHEL, Physique théorique  
POITOU, Méthodes mathématiques de la physique  
ROUBINE, Physique  
TRIDOT, Chimie appliquée  
LEBRUN, Radioélectricité
- Secrétaire : Mme BOUCHEZ

Nos contacts avec l'industrie lainière nous ont inspiré le sujet de cette thèse. Nous n'aurions cependant pu mener notre travail à terme, sans la haute bienveillance de Monsieur le Professeur Paul BOULANGER, qui a accepté de nous guider dans nos recherches, nous a encouragé à les poursuivre, et a mis à notre disposition son remarquable service de chromatographie et d'électrophorèse du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lille ; qu'il veuille trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Notre reconnaissance va également à Monsieur le Professeur agrégé Gérard BISERTE, qui est devenu pour nous un ami, et qui nous a constamment éclairé de ses conseils. Sa vaste connaissance de la chimie des protéines nous a été d'un précieux secours, et il nous a fait partager son enthousiasme pour la recherche.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur Jean GERMAIN, que nous avons eu souvent le plaisir de rencontrer, et qui nous fait l'honneur de présider le jury de notre thèse.

Nos remerciements vont aussi à Messieurs les Professeurs BONNEMAN et GLACET qui ont accepté avec une grande obligeance de juger notre travail.

Enfin nous tenons à associer à notre reconnaissance nos anciens professeurs de la Faculté libre des sciences et de l'Ecole des Hautes Etudes Industrielles de Lille qui nous ont initié à la recherche scientifique.

Que nos camarades R. OSTEUX, J. MONTREUIL, M. DAUTREVAUX, J. LATTURAZE et J. HOLLEMAN, veuillent bien trouver ici l'expression de nos sentiments amicaux pour les excellents moments passés en leur compagnie au laboratoire de chimie biologique.

Nous remercions Madame J. HOLLEMAN-DEHOVE et Mesdemoiselles M.T. PICQUE et F. VAN PETEGHEM pour leur collaboration technique et dévouée.

---

T A B L E D E S M A T I E R E S

	<u>Pages</u>
TABLE DES MATIERES	1
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION	9

P R E M I E R E P A R T I E

E T A T A C T U E L D E N O S C O N N A I S S A N C E S S U R L A S T R U C T U R E M O R P H O L O G I Q U E  
E T C H I M I Q U E D E L A F I B R E D E L A I N E .

C H A P I T R E 1 : S T R U C T U R E M O R P H O L O G I Q U E .

La cuticule	11
L'épicuticule	12
La subcuticule	13
Le cortex	13
Conclusion	14
Bibliographie	18

C H A P I T R E 11 : S T R U C T U R E C H I M I Q U E .

I n t r o d u c t i o n

Les caractéristiques essentielles des kératines.	19
Les causes de la variabilité de la composition chimique de la laine.	20
A <u>Composition chimique de la kératine de laine.</u>	22
1) Composition élémentaire.	22
2) Composition en amino-acides.	22
3) Les caractéristiques de la composition en amino-acides de la laine.	27.

	<u>pages</u>
B - <u>Les groupements terminaux libres.</u>	32
1) Détermination des groupements $\alpha$ -aminés terminaux libres de la laine.	32
2) Détermination des groupements $\alpha$ -carboxyliques terminaux libres de la laine.	34
C - <u>La séquence des amino-acides dans la kératine de laine.</u>	35
D - <u>L' hétérogénéité chimique de la fibre de laine : Sa structure macromoléculaire.</u>	37
1) Composition chimique des différents constituants morphologiques.	37
2) Fractionnement en différents "polypeptides". Caractéristiques moléculaires de ces "polypeptides".	38
a) Solubilisation par des solutions de sulfures alcalins.	39
b) Solubilisation par des solutions d'urée contenant du bisulfite ou d'autres réducteurs.	40
c) Solubilisation par des solutions de thioglycolate alcalin.	43
d) Solubilisation après oxydation des liaisons disulfures.	46
3) Nouvel aspect de l'hétérogénéité de la fibre de laine : la structure bilatérale du cortex.	49
4) Composition en amino-acides des différents éléments constitutifs de la fibre de laine.	52
5) Conclusions.	54
E - <u>La réactivité des liaisons disulfures.</u>	55
1) Les travaux de PHILLIPS : La classification de la cystine de la laine en fractions de réactivité chimique différente. Réaction de la cystine de la laine avec :	55
a) le bisulfite de sodium.	58
b) les alcalis.	61
c) le cyanure de potassium.	63
d) le formol.	64
e) l'acide thioglycolique.	65

	<u>pages</u>
2) Les raisons de la réactivité variable des liaisons disulfures de la laine.	66
3) Les travaux d'ALEXANDER : Réaction de la cystine de la laine avec les agents d'oxydation.	68
4) Conclusion .	
F - <u>La réactivité des groupements polaires.</u>	71
1) Réactivité des groupements carboxyliques.	71
2) Réactivité des groupements aminés.	72
a) Alkylation et Arylation.	72
b) Acylation.	73
c) Désamination.	74
3) Réactivité des hydroxyamino-acides.	74
4) Formation de nouvelles liaisons transversales.	75
G - <u>La structure stéréochimique de la kératine.</u>	78
1) La structure de la $\beta$ -kératine.	79
2) La structure de l' $\alpha$ -kératine.	79
3) La structure en hélice de Pauling-Corey.	82
Bibliographie.	84

DEUXIEME PARTIE

R E S U L T A T S   P E R S O N N E L S

pages

CHAPITRE 1 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

1) Matériel utilisé.	89
II) Dosage de l'Azote.	89
III) Dosage du soufre thiol et disulfure.	89
IV) Dosage de la tyrosine.	94
V) Chromatographie de partage sur papier.	95
VI) Chromatographie sur résines à échange d'ions.	97

CHAPITRE II : HYDROLYSE CHIMIQUE MENAGEE

EN MILIEU ACIDE FAIBLE NEUTRE et ALCALIN.

A - <u>Hydrolyse en milieu acide faible ou neutre.</u>	99
1) Conditions expérimentales.	99
2) Résultats expérimentaux.	
a) Cinétique de la libération d'azote et de soufre.	100
b) Etude chromatographique.	100
B - <u>Hydrolyse en milieu alcalin.</u>	103
C - <u>Conclusion.</u>	105

CHAPITRE III : HYDROLYSE MENAGEE DE LA FIBRE DE LAINE

PAR L'ACIDE SULFURIQUE DECINORMAL.

A - <u>Conditions expérimentales.</u>	107
---------------------------------------	-----

	<u>PAGES</u>
B - <u>Résultats expérimentaux.</u>	108
1) Cinétique de la libération d'azote et de soufre.	108
2) Etude chromatographique de la fraction "amino-acide " de l'hydrolysate.	114
3) Composition en amino-acides de la laine traitée par $\text{SO}_4\text{H}_2$ 0,1 N.	119
4) Aspect microscopique de la laine traitée par $\text{SO}_4\text{H}_2$ 0,1 N.	124
5) Composition en amino-acides des "polypeptides thermosolubles ".	126
C - <u>Conclusions.</u>	132
 <u>CHAPITRE IV : HYDROLYSE MENAGEE DES CELLULES CORTICALES</u> <u>DE LA LAINE PAR L'ACIDE SULFURIQUE DECINORMAL.</u>	
A - <u>Préparation des cellules corticales.</u>	135
B - <u>Résultats expérimentaux.</u>	136
C - <u>Comparaison entre l'hydrolyse sulfurique des</u> <u>"cellules corticales " et celle de la "laine".</u>	136
D - <u>Conclusions.</u>	140
 <u>CHAPITRE V : HYDROLYSE DE LA LAINE PAR LA PEPSINE CRISTALLISEE.</u>	
A - <u>Hydrolyse pepsique de la laine intacte.</u>	143
B - <u>Hydrolyse pepsique de laines modifiées par des</u> <u>réactifs chimiques.</u>	148
1) Laine réduite.	148
2) Laine oxydée.	152
3) DNP. - laine.	153

	<u>pages</u>
<u>CHAPITRE VI: HYDROLYSE DE LA LAINE PAR LA PAPAÏNE CRISTALLISEE.</u>	
A - <u>Préparation de la papaïne cristallisée.</u>	155
B - <u>Hydrolyse papaïnique de la laine en présence de bisulfite.</u>	156
C - <u>Etude électrophorétique de l'hydrolysate papaïnique.</u>	157
D - <u>Hydrolyse papaïnique de laines dont on a modifié les liaisons disulfures.</u>	158
E - <u>Etude électrophorétique de l'hydrolysate papaïnique de laine oxydée.</u>	161
F - <u>Hydrolyse papaïnique de la DNP-laine.</u>	163
<u>Conclusions sur l'hydrolyse enzymatique de la laine.</u>	164
CONCLUSIONS GENERALES.	166
BIBLIOGRAPHIE.	170

---

AVANT - P R O P O S

A la conférence internationale de la recherche lainière, qui s'est tenue en Australie au mois d'août 1955, le docteur E.G. CARTER déclarait : " Les recherches qui ont été faites jusqu'à présent nous ont appris que la laine est la fibre la plus complexe qui ait jamais existé, aussi c'est dans cette complexité qu'il faut chercher le secret de la suprématie de la laine comme fibre textile; il est inconcevable que l'on puisse un jour synthétiser une fibre d'une complexité équivalente ".

La laine, utilisée par l'Homme depuis l'époque néolithique, est donc restée la " fibre unique ", malgré l'apparition de nombreux autres matériaux fibreux.

Les fibres naturelles, telles le lin ou le coton, les fibres artificielles à base de protéines régénérées, comme celles obtenues à partir des protéines de l'arachide, de la zéine du maïs et de la caséine, ou de cellulose régénérée (Viscose), ou modifiée ( Rayonne Acétate), enfin les fibres synthétiques nées du progrès de la chimie des molécules géantes et qui, depuis quelques années, sont en train de conquérir une place importante dans certains domaines du textile, toutes ces fibres peuvent posséder certaines qualités à un degré plus élevé que la laine, mais aucune ne réunit à la fois toutes les qualités de cette dernière, et notamment les plus recherchées : sa douceur, son élasticité et sa chaleur.

Pour les fibres synthétiques, qu'elles soient de la classe des polyamides, des polyvinyliques, des polyacrylonitriles, des polyesters, etc... la laine reste, sur beaucoup de points, le modèle à imiter.

L'étude de la structure de la laine présente donc un intérêt pratique immédiat; d'une part, une meilleure compréhension de celle-ci doit permettre à l'industrie lainière d'améliorer cette fibre sur les quelques points où ses qualités sont moins satisfaisantes : lui donner, notamment, une meilleure résistance aux traitements alcalins, aux mites et aux microorganismes, et une meilleure irrétrécissabilité; d'autre part, la connaissance approfondie

de cette structure doit inspirer la chimie de synthèse dans l'élaboration de nouvelles fibres. C'est ainsi que CHAMPETIER (1955) (1) préparait récemment de nouveaux superpolyamides, dont les chaînes sont unies par des liaisons disulfures comme le sont les chaînes polypeptides de la kératine de la laine. Enfin, il est permis de déduire des recherches récentes de certains laboratoires, que l'une des prochaines fibres synthétiques qui apparaîtra sur le marché, sera vraisemblablement obtenue par polycondensation d'acides aminés, et sera donc en quelque sorte une laine synthétique.

L'intérêt scientifique des études sur la structure de la laine n'est pas moins important : car elles apportent leur contribution au problème général de la structure des protéines, notamment en ce qui concerne la question des liaisons disulfures, la structure stéréochimique de la kératine, etc..

Il est intéressant de rappeler, par exemple, que ce sont les études de CONSDEN et GORDON (1950) (2) sur les peptides des hydrolysats partiels de laine qui ont, pour la première fois, réfuté la théorie de la périodicité des acides aminés dans la structure primaire des protéines. La découverte d'enchaînements peptidiques : glutamylglutamique, aspartylaspartique, au moyen de la chromatographie de partage sur papier (mise au point à la Wool Industries Research Association, Torridon, Headingley, Leeds) était en effet peu compatible avec l'hypothèse de BERGMANN-NIEMANN.

Dans ce présent travail, nous avons essayé d'apporter une modeste contribution au problème extrêmement complexe de la structure chimique de la kératine de laine. Nous avons notamment abordé l'étude des produits d'hydrolyse partielle acide et enzymatique de la laine, au moyen des techniques modernes de chromatographie sur papier, de fractionnement sur résine à échange d'ions, d'électrophorèse différentielle. Par ailleurs, nous avons suivi plus particulièrement, à l'aide de dosages colorimétriques spécifiques, la distribution, dans ces différentes fractions peptidiques, de deux acides aminés caractéristiques : la cystine et la tyrosine.

---

#### BIBLIOGRAPHIE

1. CHAMPETIER (G.) et KHALADJI (J.), Bull. Soc. Chim., 1955, 22, 1623.
2. CONSDEN (R.) et GORDON (A.H.), Biochem.J., 1950, 46, 8.

## INTRODUCTION

Tous les poils des Mammifères appartiennent à la même famille de protéines : les Kératines ; ils ont une structure générale chimique très voisine de celle des cellules épithéliales de la peau, de la corne, des ongles, des sabots et des plumes.

La laine est le poil constituant la toison du mouton, mais il faut établir une nette distinction entre la fibre utilisée par l'industrie textile et le poil de l'animal. Le poil est en effet formé de deux parties : une partie vivante, la " racine ", située dans les follicules de l'épiderme, et formée de cellules en voie de kératinisation, et une partie morte, où les cellules sont totalement kératinisées; c'est cette dernière qui possède, seule, les caractéristiques de la fibre textile, non sans avoir été au préalable débarrassée par lavage des sels minéraux ( le suint ) et de la grande quantité de cire ( la lanoline ) qui la recouvrent.

Notre étude a porté uniquement sur la laine " fibre textile " ; mais il est impossible d'étudier sa structure chimique, sans tenir compte du fait que cette fibre est un produit d'origine vivante. Au cours de sa croissance, un grand nombre de facteurs ont pu varier et influencer plus ou moins sur sa composition chimique; des études ont montré notamment l'influence de la race, de la nourriture, de l'état de santé de l'animal, de la richesse du sol en oligoéléments, du soleil et des intempéries, sur sa richesse en cystine et sur ses propriétés mécaniques. Par ailleurs, la fibre possède une structure histologique très complexe et, s'il est très vraisemblable que les différents composants morphologiques sont formés de diverses protéines n'ayant pas toutes la même composition, il est pratiquement impossible de les étudier séparément, car on ne peut les isoler sans modifier assez profondément leur nature chimique.

Enfin, la structure ne peut être élucidée complètement que si l'on étudie, notamment au moyen des diagrammes de diffraction de rayons X, l'arrangement spatial des atomes constituant la macromolécule de kératine.

Il nous semble donc indispensable, avant d'exposer le résultat de nos recherches personnelles, de faire le point de nos connaissances actuelles sur la structure morphologique, chimique et stéréochimique de la laine. Nous avons spécialement insisté sur l'exposé des travaux effectués par de nombreux chercheurs, durant ces dix dernières années, sur la structure chimique de la laine; car une revue générale de ces travaux n'a pas, jusqu'à présent, été faite en langue française.

---

P R E M I E R E   P A R T I E

E T A T   A C T U E L   D E   N O S   C O N N A I S S A N C E S  
S U R   L A   S T R U C T U R E   M O R P H O L O G I Q U E   E T   C H I M I Q U E  
D E   L A   F I B R E   D E   L A I N E

C H A P I T R E   1

S T R U C T U R E   M O R P H O L O G I Q U E

Une mise au point bibliographique de la question a été faite en 1952 par PARISOT (1) et plus récemment, en 1954, par ALEXANDER (2). Nous pouvons résumer ainsi leurs études.

Suivant leur provenance les fibres de laine ont des diamètres variant de 18 à 40  $\mu$ , les plus fines étant les plus recherchées; quant à leur longueur elle varie considérablement avec de nombreux facteurs : époque de la tonte, race de l'animal, partie du corps où les fibres sont prélevées, etc..

Quelles que soient leur origine et leurs dimensions, toutes les fibres de laines sont formées de deux couches principales de cellules : la cuticule et le cortex. Certaines laines grossières possèdent en outre un canal central appelé " médulle " formé de cellules vides; l'absence de médulle est caractéristique des laines fines, les seules dont nous nous sommes occupés.

L A   C U T I C U L E

La cuticule, qui représente 2 à 10 % du poids de la fibre; est une gaine protectrice qui entoure la fibre sur toute sa longueur. Elle est formée de cellules aplaties en forme d'écailles ( voir fig.1 & 2). Examinées au microscope optique, celles-ci présentent un arrangement semblable à celui des tuiles d'un toit. Il semble bien que ces écailles ne forment pas autour de la fibre une membrane continue, mais que ce sont des cellules distinctes et séparées qui se chevauchent. MERCER et REES (1946) (3) ont montré à l'aide du microscope

électronique que cette cuticule a une structure complexe. D'après ces auteurs, une fibre traitée par la trypsine présente des cannelures, alors qu'une fibre intacte a une surface externe relativement lisse; ils en concluent que la cuticule est formée d'une couche  $K_1$  digestible par les enzymes et d'une couche  $K_2$  résistante; ils admettent que ces deux couches sont des variétés de kératine; LINDBERG, MERCER et coll. (1949) (4) ont proposé d'appeler  $K_1$  : exocuticule, et  $K_2$  : endocuticule.

### L'EPICUTICULE

L'existence de cette membrane, soupçonnée par plusieurs expérimentateurs, a été mise en évidence par LINDBERG, PHILIP et GRALEN (1948) (5). En dissolvant de la laine dans une solution de sulfure de sodium à 1 %, ils observèrent qu'une faible opalescence subsistait dans la solution, même après un mois; ils recueillirent par centrifugation un léger dépôt qui, observé au microscope électronique, se présente sous la forme de très minces membranes lisses d'une épaisseur comprise entre 50 et 250 Å. Par la suite, ils montrèrent que l'on pouvait obtenir les mêmes membranes, simplement en agitant de la laine chlorée dans l'eau, ce qui prouve que l'épicuticule se trouve sur la surface de la fibre. Bien que ne représentant pas plus de 0,1 % du poids de la fibre, cette épicuticule semble retarder la pénétration des colorants et des grosses molécules à l'intérieur de celle-ci; elle déterminerait également les propriétés physiques de la surface : mouillabilité, propriétés de friction, etc.. Sa composition chimique a fait l'objet de plusieurs investigations, mais, étant donné qu'il est impossible d'en obtenir des échantillons qui ne soient pas contaminés par d'autres portions de la fibre, l'interprétation des résultats analytiques est difficile. D'après LAGERMALM et GRALEN (1951) (6) elle contient des amino-acides et des glucides. Pour ULTEE, SCHOONEVELDT et SCHURINGA (1953) (7), l'épicuticule est une protéine différente des autres protéines de la laine; les glucides que l'on trouve dans les préparations de cette épicuticule proviendraient d'impuretés cellulosiques toujours présentes dans les laines commerciales.

La discussion reste ouverte pour savoir si l'épicuticule est une membrane continue qui recouvre toute la fibre, ou si au contraire, elle ne constitue que la couche la plus externe de chaque écaille.

### LA SUBCUTICULE.

L'existence de cette membrane est un des points les plus controversés de la structure morphologique de la laine.

En 1937, REUMUTH (8) déduisit de ses observations microscopiques qu'une membrane continue, qu'il appela la subcuticule, devait exister entre les écailles et les cellules corticales de la fibre. Par la suite, plusieurs auteurs dont LEHMANN (1941) (9), ELOD et ZAHN (1944, 1946, 1950) (10), et notamment ALEXANDER et EARLAND (1950) (11) mirent au point des méthodes chimiques et enzymatiques, pour isoler cette subcuticule. La méthode d'ALEXANDER semble la plus favorable, car elle est la moins brutale : il oxyde toutes les liaisons disulfures des protéines de la fibre, avec de l'acide peracétique dilué et froid, et procède ensuite à une extraction avec de l'ammoniaque 0,1 N., qui dissout 90 % environ des protéines oxydées. Il reste finalement un résidu représentant 7 à 8 % du poids total, qui se présente au microscope sous forme d'un tube strié longitudinalement. D'après ALEXANDER, il s'agirait de la subcuticule. La résistance chimique de cette membrane de nature protéique et son insolubilité seraient dues à une structure de  $\beta$  - kératine riche en liaisons hydrogène intermoléculaires, ainsi qu'à des liaisons de covalence non hydrolysables, telles que des ponts éther entre deux résidus de tyrosine.

Plusieurs auteurs contestent l'existence de la membrane d'ALEXANDER : elle serait un artefact dû au traitement d'oxydation (MANOGUE, MOSS et ELLIOTT) (1954) (12). Dernièrement, FRASER et ROGERS (1955) (13) ont observé, avec un microscope à contraste de phase, la subcuticule ombrée à l'or et conclurent que cette membrane est formée des résidus d'un certain nombre de composants histologiques de la fibre : les membranes des cellules corticales, les membranes nucléaires, les restes des noyaux et les fibrilles résistantes dérivées du cortex; d'après ces auteurs, la subcuticule n'existerait donc pas comme composants histologique dans une fibre intacte.

### LE CORTEX

C'est le constituant le plus important de la fibre, puisqu'il représente plus de 90 % de son poids; il en détermine les propriétés physiques : diagrammes aux rayons X, élasticité, résistance.

Il est formé d'un faisceau de cellules allongées appelées " cellules corticales " ( voir figures 2 et 21), soudées entre elles par un ciment intercellulaire de nature protéique. Pour les mettre en évidence, il faut soumettre les fibres à une digestion enzymatique, qui solubilise le ciment et une partie de la cuticule, et libère les cellules corticales relâchées ( voir deuxième partie, chapitre V.)

Ces cellules ont une section polygonale, leurs dimensions varient entre 80 et 100  $\mu$  de longueur, 2 à 5  $\mu$  de largeur et 1,2 à 1,6  $\mu$  d'épaisseur ( PARISOT 1952) (14). On peut observer dans le centre de la cellule une zone sombre, non biréfringente, qui correspondrait à l'ancien noyau : noyau que possédait la cellule avant de subir la kératinisation.

D'autre part, ces cellules ont une apparence striée, car elles sont formées de fibrilles. HOCK, RAMSAY et HARRIS (1941-1943) (15) ont réussi sous le microscope optique, à séparer ces fibrilles à l'aide d'un micromanipulateur: elles ont des largeurs inférieures au micron. A leur tour ces fibrilles apparaissent au microscope électronique comme formées de microfibrilles de 20 à 40  $\text{\AA}$ . de largeur. ZAHN (1940) (16), MERCER et REES (1946) (17) ont montré que ces microfibrilles sont les plus petites unités structurales de la fibre, et ils pensent qu'elles sont maintenues ensemble par un ciment, pour former les fibrilles.

Pour GORTER et HOUWINCK (1948) (18), ce ciment serait un artefact dû à l'action de l'enzyme sur les fibrilles. D'après FARRANT, REES et MERCER (1947) (19), ces microfibrilles, qui constituent la partie indiscutablement fibreuse de la laine, ne seraient que l'agrégation, dans le sens de la longueur, de protéines globulaires; la kératine aurait ainsi une structure semblable à celle de la fibrine ( PORTER et HAWN) (1949) (20), ou de la F-actine (PERRY et REED) (1947) (21); cette idée ne peut cependant pas être considérée comme bien établie.

#### C O N C L U S I O N

La fibre de laine apparaît donc comme un véritable tissu biologique ayant une structure très complexe, que l'on peut schématiser ainsi :

- 1) Une zone externe comprenant :
  - a) l'épicuticule, extrêmement mince ;
  - b) la cuticule, formée elle-même de l'exocuticule et de l'endocuticule;
- 2) Une zone intermédiaire : la subcuticule, dont l'existence n'est cependant pas certaine;
- 3) Une zone interne , le cortex, comprenant :
  - a) le ciment ,
  - b) les cellules formées de fibrilles, elles-mêmes composées de microfibrilles.

L'existence de cette structure morphologique complique singulièrement l'étude de la structure chimique de la laine. En effet, aussi longtemps que l'on n'aura pas découvert le moyen de dissocier la fibre en ses différents constituants histologiques, par des procédés purement mécaniques, il sera impossible de savoir si chaque constituant a une structure chimique qui lui est propre, ou si au contraire, la fibre dans son ensemble possède une unique structure moléculaire.

---



SUS  
1912

FIGURE 1

MICROPHOTOGRAPHIE D'UNE FIBRE DE LAINE MERINOS



FIGURE 2

DIAGRAMME D'UNE FIBRE DE LAINE D'APRES REUMUTH

BIBLIOGRAPHIE

- 2 - ALEXANDER (P.) et HUDSON (F.), Wool : its chemistry and Physics  
(Chapman et Hall éditeurs) 1954 p.l.
- 11 - ALEXANDER (P.) et EARLAND (C.), Textile Research J., 1950, 20, 298.
- 10 - ELÖD (E.) et ZAHN (H.), Kolloid Z., 1944, 108, 94;  
Naturwissenschaften, 1946, 33, 158.
- 19 - FARRANT (J.L.), REES (A.L.G.) et MERCER (E.H.), Nature, 1947, 159, 535.
- 13 - FRASER (R.D.B.) et ROGERS (G.E.), Textile Research.J., 1955, 25, 235.
- 18 - GORTER (C.J.) et HOUWINK (A.L.), Proc. Konink. Nederland.  
Akad. Wetenschop, 1948, 51, 262.
- 15 - HOCK (C.W.), RAMSAY (R.C.) et HARRIS (M.), J. Res. nation. Bur.  
Stand., 1941, 27, 181 ; 1943, 31, 234.
- 6 - LAGERMALM (G.) et GRALEN (N.), Acta. Chem. Scand., 1951, 5, 1209.
- 9 - LEHMANN (E.), Melliand Textilber., 1941, 22, 145.
- 4 - LINDBERG (J.), MERCER (E.H.), PHILLIP (B.) GRALEN (N.), Textile  
Research.J., 1949, 19, 673.
- 5 - LINDBERG (J.), PHILIP (B.) et GRALEN (N.), Nature, 1948, 162, 458.
- 12 - MANOGUE (B.), MOSS (H.S.) et ELLIOTT (R.L.), J. Soc. Dyers Colourists,  
1954, 70, 502.
- 3 - 17 - MERCER (E.H.) et REES (A.L.G.), Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.,  
1946, 24, 147, 175.
- 1 - 14 - PARISOT (A.), LEVEAU (M.) et DERMINOT (J.), Bull. Inst. textile  
France, 1952, n°35, 9.
- 21 - PERRY (S.V.) et REED (R.), Biochim. Biophys. Acta, 1947, 1, 39
- 20 - PORTER (K.R.) et HAWN (C.V.Z.), J. Exp. Med., 1949, 90, 225.
- 8 - REUMUTH (H.), Dissertation ( Aix-la-Chapelle), 1937.
- 7 - ULTEE (A.J.), SCHOONEVELDT ( Jr.C.J.) et SCHURINGA (G.J.), Biochim.  
Biophys. Acta, 1953, 10, 590.
- 10 - ZAHN (H.), Melliand Textilber., 1950, 31, 695.
- 16 - ZAHN (H.), Melliand Textilber., 1940, 21, 505.
-

## CHAPITRE 11

### STRUCTURE CHIMIQUE

#### INTRODUCTION

#### Les caractéristiques essentielles des kératines.

Du point de vue chimique, la fibre de laine est formée d'une ou de plusieurs protéines du groupe des kératines. Ce groupe est assez complexe; on y distingue généralement deux types : les kératines "tendres " que l'on isole, par exemple, de l'épiderme de la peau humaine ou de la peau des lèvres des bestiaux, et les kératines " dures ", constituants essentiels des ongles, des griffes, des cornes, des sabots, des plumes, des poils, des cheveux, et de la laine.

Les kératines sont caractérisées essentiellement par :

- 1) leur insolubilité dans l'eau et les solutions salines,
- 2) leur résistance assez marquée à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques,
- 3) leur résistance assez nette, également, à l'hydrolyse par les acides dilués et chauds,
- 4) enfin, leur richesse en soufre, nettement plus élevée que dans

les autres protéines. Les kératines douces ont des teneurs en soufre plus faibles que les kératines dures, mais qui dépassent cependant celles de beaucoup d'autres protéines. Cette richesse en soufre s'échelonne en effet de 1,9 % pour l'épiderme de la peau humaine à 5 - 5,2 % pour les cheveux. Ce soufre appartient essentiellement à la cystine qui crée des ponts disulfurés entre les différentes chaînes polypeptidiques de la molécule; la méthionine, - autre amino-acide soufré que l'on rencontre dans les protéines, - n'existe qu'en faible proportion dans les kératines ( 0,7 à 1 % dans les kératines dures, 1 à 2 % dans les kératines tendres). Il est intéressant de remarquer que dans le groupe des protéines globulaires, seules deux hormones : l'insuline et la prolactine, ont des teneurs en cystine comparables à celles des kératines ( 12,5 % de cystine dans l'insuline).

Outre leur richesse en cystine, les kératines contiennent encore un grand nombre d'acides aminés à chaînes latérales polaires, et il est possible que la ténacité de la fibre de laine, par exemple, puisse être attribuée pour une grande part à des forces intermoléculaires entre groupements polaires aussi bien qu'aux liaisons disulfures (TRISTRAM)(1953) (1).

Les causes de la variabilité de la composition chimique de la laine.

Parmi le groupe des kératines, la laine a été, de loin, la plus soigneusement étudiée et analysée. Il est cependant difficile de donner une analyse chimique exacte de la kératine de la laine pour plusieurs raisons :

1) La laine a une structure morphologique complexe ; aussi il est à peu près certain que cette complexité histologique va de pair avec une hétérogénéité chimique ; ainsi la kératine du cortex est plus riche en soufre que la fibre dans son ensemble.

2) Les différentes races de moutons (+) fournissent des laines de qualités différentes et l'on classe généralement celles-ci d'après leur finesse. Les propriétés physiques (élasticité, ténacité, couleur, lustre, frisure, etc.) varient assez nettement avec la finesse ; mais la composition chimique est également légèrement variable.

3) On enregistre même des variations de composition (notamment en soufre) le long d'une même fibre. Ces variations sont dues aux facteurs les plus divers : changements de saison, fluctuations dans la valeur nutritive de la nourriture pendant la croissance de la fibre, richesse du sol en oligoéléments, intempéries, etc..

4) Enfin, les différents auteurs qui ont étudié la composition en acides aminés de la laine, non seulement ont analysé des fibres d'origines variées mais généralement ont utilisé des techniques analytiques assez différentes dans leurs principes. Les résultats obtenus ne sont donc pas forcément concordants entre eux, ces techniques étant par ailleurs d'un maniement assez délicat.

---

(+) VON BERGEN et MAUERSBERGER (2) énumèrent 22 races différentes de moutons.

Toutes ces raisons font qu'il est difficile de considérer la kératine de laine comme un composé chimiquement défini; mais il est possible que les variations de composition constatées entre les différents constituants d'une même fibre, ou entre des fibres d'origines différentes, soient de peu d'importance en ce qui concerne la structure fondamentale de la kératine.

A - Composition chimique de la kératine de laine

1) Composition élémentaire de la kératine de laine.

L'analyse élémentaire révèle la présence de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote et de soufre.

Les différents résultats quantitatifs qui ont été publiés se trouvent dans les limites suivantes :

Carbone	50 à 51 %
Hydrogène	7 à 8 %
Oxygène	22 à 25 %
Azote	16 à 17 %
Soufre	3 à 4 %

Même soigneusement lavée, la laine contient toujours un très faible pourcentage de matières minérales : elles sont dosées sous forme de cendres ( en moyenne 0,1 %).

2) Composition en amino-acides de la fibre de laine.

Les premiers résultats sur la composition en amino-acides de la laine ont été publiés en 1907 par ABDERHALDEN et VOITINOVICI (3) : ces auteurs utilisaient le procédé de distillation des esters de FISCHER (1901) (4). Depuis cette époque, un grand nombre de chercheurs (+), utilisant pour chaque acide aminé individuel une technique spécifique de dosage, ont publié des résultats plus ou moins partiels sur cette composition.

Récemment, GOLDEN, WHITWELL et MERCER (1955) (6) ont dosé un certain nombre d' amino-acides de la laine, par une technique quantitative de chromatographie sur papier. Cette méthode est assez peu précise et certains de leurs résultats ( voir tableau 1) sont difficilement comparables avec ceux qu'ont obtenus d'autres auteurs; WARD et Coll. (1955) (7) ont d'ailleurs fait remarquer que les valeurs qu'ils donnent pour l'alanine, la phénylalanine et la valine sont si faibles, qu'en peut supposer que l'hydrolyse était incomplète.

---

(+) SIMMONDS (1954) (5) a relevé 47 références bibliographiques se rapportant à la composition chimique de la laine.

La première analyse complète a été donnée par SIMMONDS en 1954 (8). Cet auteur a utilisé la méthode chromatographique sur résines à échange d'ions de MOORE et STEIN (1951) (9), en même temps que des méthodes spécifiques de dosage pour la cystine, la méthionine, le tryptophane et la proline. En 1955, CORFIELD et ROBSON (10) ont déterminé, de leur côté, la composition en amino-acides de la laine, et bien qu'ils aient utilisé la même laine (Mérinos de finesse 64's) et la même technique, leurs résultats ne sont pas absolument superposables à ceux de SIMMONDS; une première différence est relative aux teneurs en azote total et en soufre total (voir tableau 1), qui ne sont pas tout à fait les mêmes pour les deux échantillons; par ailleurs, SIMMONDS trouve des teneurs en alanine, histidine, leucine, lysine, phénylalanine et valine d'environ 20 % inférieures à celles qui ont été trouvées par CORFIELD et ROBSON.

Certains auteurs ont également mis en oeuvre des techniques de dosages microbiologiques des acides aminés. En 1949, GRAHAM, WÄITKOFF et HIER (11) ont publié une analyse assez complète de la laine; seuls l'alanine, le glyco-colle, la sérine et le tryptophane n'ont pas été dosés. Plus récemment, WARD, BINKLEY et SNELL (1955) (12) ont comparé la composition en amino-acides de laines de différentes finesses.

Les résultats obtenus par tous ces auteurs sont résumés dans le tableau 1. L'examen de ce tableau montre évidemment des variations de composition suivant les échantillons analysés. Mais il apparaît que ces variations peuvent être attribuées beaucoup plus aux techniques différentes utilisées et au manie-ment de ces techniques par des expérimentateurs différents, qu'à une composition nettement variable des fibres, suivant leur origine. En effet les résultats de WARD et Coll. (colonnes 4, 5 et 6 du tableau 1), qui se rapportent à trois échantillons différents, font apparaître dans l'ensemble des variations trop minimes pour que l'on puisse affirmer qu'elles correspondent à des compositions différentes; les concordances sont moins bonnes pour le glyco-colle, l'histidine et la valine mais ceci peut être dû à des difficultés analytiques.

Enfin il faut signaler que MIDDLEBROOK (1949) (13) a trouvé que la laine contenait environ 0,18 % d'hydroxylysine.

En conclusion, on peut considérer que les résultats les plus valables, sur la composition en amino-acides de la laine, sont ceux de SIMMONDS et de CORFIELD et ROBSON, qui ont été obtenus par la méthode de MOORE et STEIN, puisque ces chercheurs ont pu retrouver 99 % de l'azote total de la fibre sous forme d'acides aminés. Les résultats obtenus par les méthodes microbiologiques sont en effet moins précis, puisque WARD et Coll. ne retrouvent que 81 % de l'azote total, alors que les seuls amino-acides qu'ils n'aient pas dosés, - tryptophane et hydroxylysine, - n'existent qu'en très petites quantités dans la laine. Cette imprécision empêche malheureusement de conclure de façon certaine, - comme sembleraient le montrer les résultats de WARD et Coll., - que des laines d'origines différentes ont des compositions chimiques très voisines sinon identiques. Il est souhaitable que le problème de la composition des différentes laines soit repris à l'aide de la technique de MOORE et STEIN.

T A B L E A U - 1

Composition en amino-acides de différentes laines.

AUTEURS	Méthode de MOORE et STEIN		Méthodes microbiologiques				Chromatog s/papier
	1	2	3	4	5	6	7
	SIMMONDS	CORFIELD et ROBSON	GRAHAM & Coll.	WARD & Coll.	WARD	WARD (+)	GOLDEN & Coll.
	(14)	(15)	(16)	(17)	(17)	(17)	(18)
Qualité	Mérinos austral.	Mérinos austral.		Idaho Rambouil.	Mérinos austral.	Nouvelle Zélande	Mérinos austral.
Finesse	64's	64's		64's	70's	58's	70's
Diamètre moyen ( en microns.)	20,7	20,7		20,7	19,7	24,9	19,7
Composition élémentaire							
Carbone en %	50,3						
Hydrogène en %	8,13						
Azote total -	16,62	16,35	16,2	16,80	16,78	16,91	
Soufre total-	3,68	3,38		3,72	3,70	3,68	
Cendres -	0,01	0,18		0,40	0,42	0,38	
Amino-acide	En grammes pour 100 grammes de laine anhydre						
Alanine	3,71	4,3		3,83	3,73	3,89	1,6
Arginine	10,49	9,8	10,6	9,09	9,02	9,29	10,7
Aspartique(acide)	6,69	6,8	7,2	6,22	6,28	6,31	8,8
Azote amidé	1,42	1,10		1,10	1,10	1,10	
Cystine	11,30 (++)	10,3 (+++)	13,7 (++++)	10,8	11,00	10,9	13,1
Glutamique (acide)	14,98	14,5	15,6	12,5	12,8	13,2	16,5
Glycocolle	5,16	5,5		5,56	5,27	5,04	6,2
Histidine	0,90	1,2	1,1	1,00	1,02	0,88	
Isoleucine	3,07	3,7	4,5	3,72	3,80	3,79	
Leucine	7,63	8,9	8,1	7,74	7,63	7,60	8,1
Lysine	2,82	3,3	3,3	3,11	3,15	3,00	
Méthionine	0,69	0,56	0,6	0,54	0,55	0,54	
Phénylalanine	3,43	4,00	4,0	3,42	3,40	3,22	1,7
Proline	7,28	6,8	8,1	6,34	6,44	6,54	6,9
Sérine	9,04	9,7		7,22	7,10	7,31	10,2
Thréonine	6,55	6,5	6,7	6,52	6,58	6,73	7,0
Tryptophanne	2,10	0,94					
Tyrosine	6,38	5,5	5,6	4,28	4,06	3,74	
Valine	4,96	5,7	5,7	5,82	5,78	6,12	3,3
Azote total retrouvé	(+++++) 98,89	99,39	79,2	81	81	81	
Soufre total retrouvé	86,00			81	83	81	



Suite du Tableau 1

- (+) WARD et Coll. ont analysé au total huit échantillons de laine d'origine différente, les résultats se rapportant aux trois qualités les plus souvent rencontrées sont seuls consignés dans ce tableau
- (++) Evaluée par la méthode de SHINOHARA.
- (+++) Evaluée selon la méthode de MOORE et STEIN.
- (++++) Evaluée par la méthode chimique de KASSEL et BRAND (1938) (19).
- (+++++) SIMMONDS a trouvé 2 spots inconnus, qui représentent 1.89 % de l'azote total; il suppose que l'un d'eux correspond à l'hydroxylysine; par ailleurs, il a mis en évidence des traces d'acide cystéique.
-

### 3) Les caractéristiques de la composition en amino-acides de la laine.

La composition en amino-acides de la laine appelle quelques commentaires.

La caractéristique essentielle est évidemment la richesse en soufre, mais l'état sous lequel se trouve ce soufre pose un problème. La laine contient peu de méthionine, - 0,6 à 0,7 %, - ce qui représente 0,15 % de soufre ; or, la teneur en cystine ne correspond pas au soufre restant (soufre total moins soufre de la méthionine).

En effet, la plupart des auteurs, en additionnant les quantités de soufre représentées par la cystine et la méthionine, ne retrouvent que 80 à 85 % du soufre total : ainsi SIMMONDS ( colonne 1 du tableau 1) trouve que le soufre de la cystine et de la méthionine représentent 3,17 % du poids de la fibre, alors que l'analyse élémentaire donne une teneur en soufre de 3,68 % ; il y a donc 0,51 % de soufre qui ne provient pas de la cystine et de la méthionine. Des différences semblables ont été signalées par BARRIT (1934) (20), BAILEY (1937) (21), SCHOBERL et RAMBACHER (1940) (22), CUTHBERTSON et PHILLIPS (1945) (23) et MARSTON (1946) (24). Une explication partielle de ces divergences analytiques serait la suivante : on a montré que la cystine de la laine, sous l'influence de l'air et de la lumière solaire, pouvait se transformer partiellement en acide cystéique (  $\text{HOOC}-\underset{\substack{| \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ); par ailleurs, sous l'in-

fluence des alcalis et même de l'eau, elle pouvait donner naissance à un peu de lanthionine (  $\text{HOOC}-\underset{\substack{| \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{S}-\underset{\substack{| \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{COOH}$ ); il est donc possible qu'une partie

du soufre de la laine se trouve dans celle-ci sous forme de ces amino-acides. SIMMONDS a effectivement observé la présence d'un peu d'acide cystéique dans ses analyses, mais il estime que la quantité en est beaucoup trop faible pour expliquer le fait que 15 % environ du soufre total ne se trouve pas sous forme d' amino-acides. De plus, SIMMONDS d'une part, CORFIELD et ROBSON d'autre part, ont signalé que la teneur en cystine obtenue par la méthode chromatographique de MOORE et STEIN, était nettement inférieure à celle donnée par la méthode colorimétrique de SHINOHARA (1935) (25) habituellement utilisée pour évaluer la cystine dans la laine. En utilisant la méthode de MOORE et STEIN, CORFIELD et ROBSON trouvent 10,3 % de cystine dans la laine, la méthode de SHINOHARA leur donne une valeur de 12.3 %; en se fondant sur ce dernier chiffre, ils retrouvent

les 3.38 % de soufre obtenu par l'analyse élémentaire . Il faut cependant faire remarquer que la majorité des auteurs estiment que la teneur en soufre de la laine est nettement plus élevée et voisine de 3.7 %.

En conclusion, on peut penser que ces discordances sont dues à l'imperfection des techniques analytiques, mais il est permis de supposer également qu'une petite partie du soufre de la laine se trouverait sous forme d'un dérivé soufré non identifié.

Une deuxième caractéristique de la composition en amino-acides de la laine est la proportion d'acides à chaînes latérales contenant des groupements polaires. On y trouve en effet : 22 % d'acides dicarboxyliques (acide glutamique 15 %, acide aspartique 7 %), 14.5 % de diaminés (arginine 10.5 %, lysine 3 %, histidine 1 % ), 15.5 % d'hydroxyaminoacides (sérine 9 %, thréonine 6.5 %), et enfin 5.5 % de tyrosine.

Le tableau 2, emprunté à WARD et LUNDGREN (1954) (26), donne la répartition des groupements réactifs de la kératine de laine.

T A B L E A U - 2

( Voir page suivante)

T A B L E A U 2

Proportion des amino-acides polaires dans la laine

Groupements réactifs	Nombre d'équivalents-grammes pour 10 <sup>5</sup> g. de kératine de laine.
Carboxyles libres $\left( \begin{array}{c} -\text{C}-\text{OH} \\    \\ \text{O} \end{array} \right)$	58-66
Carboxamides $\left( \begin{array}{c} -\text{C}-\text{NH}_2 \\    \\ \text{O} \end{array} \right)$	79-98
Carboxyles + Carboxamides	137-164
Hydroxyles phénoliques	22-36
Hydroxyles alcooliques	124-148
Aminés	20-24
Basiques (total)	78-92
Noyaux aromatiques (+)	27-43
Moitié des disulfures	92-114

(+) Les noyaux aromatiques comprennent ceux qui sont capables de copuler avec les sels de diazonium c'est-à-dire : Tyrosine, plus Histidine.

(Reproduit avec l'autorisation de : ACADEMIC PRESS INC. NEW-YORK.)





l'hypothèse que la laine pourrait contenir une fraction polypeptidique, qui présenterait certaines ressemblances avec les collagènes; il faut cependant remarquer que la laine ne contient pas d'hydroxyproline, alors que cet acide se trouve abondamment dans les collagènes.

B - Les groupements terminaux libres.

1) Détermination des groupements  $\alpha$ -aminés terminaux libres de la laine.

BLACKBURN (1950) (29), utilisant la méthode de SANGER (1945) (30) au fluorodinitrobenzène (+), a évalué quantitativement les amino-acides ayant leur groupement  $\alpha$ -aminé libre dans une laine de Nouvelle-Zélande 56's (diamètre moyen 26,4  $\mu$ ). Il a trouvé que l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, la sérine, la valine, le glycoacide et la thréonine se trouvaient en fin de chaîne; ses estimations quantitatives ne peuvent être retenues car il n'a pas corrigé ses résultats pour tenir compte des pertes en D N P-amino-acides durant l'hydrolyse. Utilisant la même méthode, mais avec les corrections nécessaires, MIDDLEBROOK (1951) (31) a dosé avec précision les amino-acides N-terminaux d'une laine Lincoln; ses résultats sont résumés dans le tableau 3.

---

(+) La technique de dinitrophénylation est la suivante : on traite 1 g de laine en présence de 20 ml d'eau et 40 ml d'alcool dans lesquels on a dissous 1 g de bicarbonate de sodium et 1 ml de 2,4 dinitrofluorobenzène. Après un temps donné (72 heures à 20° C ou 48 heures à 40° C), on décante la solution, on rince abondamment la laine successivement avec de l'alcool, de l'éther, de l'acide acétique dilué et de l'eau. La laine dinitrophénylée est ensuite hydrolysée pendant 24 heures dans ClH 5,7 N à l'ébullition; les DNP-amino-acides sont séparés par chromatographie sur colonne de silice; après élution, il est possible de les évaluer quantitativement par colorimétrie.

T A B L E A U 3

Nombre de résidus d'amino-acides N terminaux dans 10<sup>6</sup> g de laine

Acide aspartique	1
Acide glutamique	2
Alanine	2
Sérine	2
Valine	4
Glycocolle	8
Thréonine	8
Total .....	<u>27</u>

Ces travaux montrent qu'il y a au moins sept types de chaînes polypeptidiques différentes dans la laine. Il est intéressant de souligner que BLACKBURN et MIDDLEBROOK, opérant sur des laines d'origine différente, retrouvent les mêmes amino-acides N-terminaux. D'autre part, TIBBS (1952) (32) a obtenu des valeurs comparables à celles de MIDDLEBROOK pour une laine Romney de grosseur moyenne, pour une laine Mérinos fine, et pour le cheveu humain; ces résultats sont évidemment, comme ceux de WARD (voir plus haut), en faveur d'une structure chimique très voisine pour des laines d'origine différente.

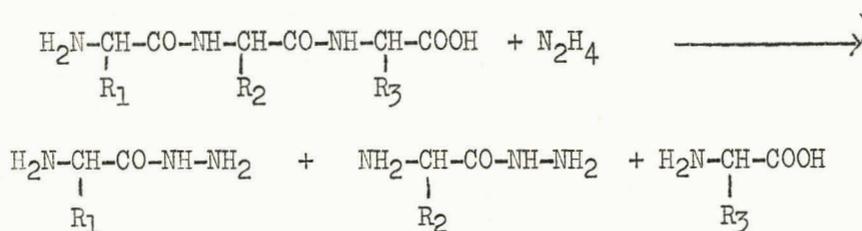
2) Détermination des groupements  $\alpha$ -carboxyliques terminaux libres de la laine.

BLACKBURN et LEE (1954) (33) utilisant une modification de la méthode d'hydrazinolyse d'AKABORI, OHNO et NARITA (1952) (34) (+), ont montré que, dans la laine, le glycocolle, l'alanine, la sérine et la thréonine avaient leur groupement  $\alpha$ -carboxylique libre; ils n'ont fait aucune estimation quantitative.

Ces résultats confirment la multiplicité des chaînes polypeptidiques dans la laine.

---

(+) La méthode consiste à chauffer la laine avec un excès d'hydrazine anhydre; les résidus d'acides-amino sont transformés en hydrazide, à l'exception de ceux qui ont leur groupement  $\alpha$ -carboxylique et qui sont libérés sous forme d'acides-amino libres.



Après enlèvement des hydrazides du mélange, les acides-amino libres sont identifiés par chromatographie sur papier.

C - La séquence des amino-acides dans la kératine de laine.

Etant donné la complexité de la molécule de kératine, peu de travaux ont été effectués pour déterminer l'arrangement des amino-acides dans les chaînes polypeptidiques. Seules quelques séquences simples ont été étudiées à partir d'hydrolysats partiels acides de laine: des dipeptides contenant de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de la cystine ont pu être isolés.

CONSDEN, GORDON et MARTIN (1949) (35) ont isolé des produits d'hydrolyse partielle de la laine, les dipeptides glutamylglutamique, glutamylaspartique et aspartylglutamique; ces travaux ont eu un certain retentissement à l'époque, car ils ont permis de réfuter pour la première fois la théorie de BERGMANN, sur la périodicité des acides aminés dans la chaîne polypeptidique. Ces auteurs ont également mis en évidence des enchaînements de l'acide glutamique avec la tyrosine, la sérine et la thréonine (MARTIN 1946) (36), ce qui semblerait démontrer, d'une façon certaine, qu'il n'y a pas dans la laine une alternance de chaînes polaires et de chaînes non polaires comme l'avait pensé ASTBURY (1943) (37), à la suite de ses études de diffraction des rayons X. Toutefois, ALEXANDER (1954) (38) admet que la fibre de laine est formée de deux composants protéiniques différents, l'un ayant un poids moléculaire élevé et donnant un diagramme d' $\alpha$ -kératine aux rayons X, l'autre ayant un poids moléculaire faible et ne montrant aucune structure orientée; pour cet auteur, il est donc possible que les dipeptides formés de deux amino-acides polaires proviennent de cette dernière fraction, et que l' $\alpha$ -kératine, à laquelle s'applique l'hypothèse d'ASTBURY, puisse effectivement présenter un arrangement alterné de chaînes polaires et non polaires.

Les peptides de la cystine, isolés facilement sous forme de peptides à acide cystéique, ont été étudiés par CONSDEN et GORDON (1950) (39). Ces auteurs ont trouvé que la cystine était enchaînée à tous les autres amino-acides, sauf à la tyrosine; par suite des difficultés d'isolement des dipeptides de la proline, ils n'ont pu mettre en évidence des dipeptides de la cystine et de la proline, mais ils ont isolé des tripeptides et des peptides plus élevés contenant de la proline et de la cystine; il apparaît donc

vraisemblable que les résidus de proline sont proches, sinon voisins, des résidus de cystine.

BLACKBURN (1950) (40) a isolé d'un hydrolysât papaïnique de laine une fraction contenant des pentapeptides. Il n'a pas déterminé l'enchaînement de ces divers acides aminés, mais il a trouvé une prédominance de glyco-  
cocolle, et une faible teneur en sérine et thréonine.

En conclusion, les résultats actuellement acquis sur la séquence des acides aminés de la laine sont encore très fragmentaires.

D - L'hétérogénéité chimique de la fibre de laine : Sa structure macromoléculaire.

La fibre de laine est formée d'au moins trois -sinon quatre - composants morphologiques distincts : l'épicuticule, la cuticule, le cortex et peut-être la subcuticule (voir plus haut). On peut donc supposer, très vraisemblablement, que la kératine de laine n'est pas une protéine homogène, et que chaque composant morphologique est formé par une protéine différente. Cette hypothèse semble confirmée par le fait qu'il existe dans la laine sept amino-acides différents, ayant leur groupement  $\alpha$  -aminé libre, ce qui indique que la fibre contient au moins sept types de chaînes polypeptidiques différentes. MIDDLEBROOK (1951) (41), qui a calculé que certaines de ces chaînes se retrouvaient jusqu'à 8 fois et qu'il y en avait 27 au total (voir tableau 3), n'a cependant pas hésité à conclure en faveur de l'homogénéité de la fibre, considérant que ces 27 chaînes polypeptidiques font partie de la même protéine, et qu'elles sont unies entre elles par les liaisons disulfures de la cystine. Calculant que le poids moléculaire moyen d'une chaîne est voisin de 60.000, MIDDLEBROOK admet donc que la kératine de laine aurait un poids moléculaire de 1.600.000.

Il n'est cependant pas facile de conclure en faveur de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité de la fibre de laine, à cause de sa structure morphologique et de son insolubilité.

1) Composition chimique des différents constituants morphologiques.

Plusieurs recherches ont été faites pour essayer de déterminer si les différents composants morphologiques ont des compositions chimiques distinctes, mais les résultats analytiques obtenus n'apportent pas une réponse satisfaisante à cette question, car il est impossible de séparer les différents constituants sans modifier chimiquement la fibre. Plusieurs auteurs (SPEAKMAN et Mc.MAHON 1938 (42), STAKHEYEVA-KAVERZNEVA 1937 (43)) ont montré que les cellules corticales, isolées de la laine par traitement de celle-ci avec des enzymes protéolytiques, sont plus riches en soufre que la fibre dans son ensemble.

Récemment, GOLDEN, WHITWELL et MERCER (1955) (44) ont trouvé que l'épicuticule contenait plus de 50 % d'amino-acides dicarboxyliques, et avait très sensiblement la même teneur en cystine que la laine; mais il faut remarquer

qu'une modification chimique de cette épicuticule peut très bien intervenir au cours du traitement d'isolement; de plus elle peut être souillée par d'autres matériaux protéiniques.

En effet, pour isoler ce constituant morphologique, qui ne représente que 0,1 % du poids de la fibre, les auteurs procèdent de la façon suivante : ils oxydent les liaisons disulfures par l'acide peracétique, épuisent la laine oxydée par l'ammoniaque et l'hydrolysent par la trypsine durant 24 heures; le résidu de l'hydrolyse trypsique est formé par un très léger dépôt, que les auteurs estiment être l'épicuticule.

Aussi longtemps que l'on ne disposera pas de moyens purement mécaniques pour séparer la fibre en ses différents constituants morphologiques, on ne pourra savoir si ceux-ci ont des compositions chimiques nettement différentes, identiques ou voisines.

La plupart des recherches pour essayer de séparer la laine en constituants homogènes se sont donc orientées vers la solubilisation de la fibre et le fractionnement des produits solubles en " polypeptides " ou en protéines "pures ". La détermination du poids moléculaire des différentes fractions doit évidemment fournir des renseignements précieux sur l'hétérogénéité de la fibre.

## 2) Fractionnement en différents " polypeptides " . Caractéristiques moléculaires de ces " polypeptides " . (+)

L'insolubilité de la laine, dans tous les solvants aqueux et organiques, gêne considérablement l'étude de la pureté et de la structure macromoléculaire de la kératine de laine; en effet, les méthodes physicochimiques de diffusion, d'électrophorèse, d'ultracentrifugation, etc., ne s'appliquent qu'à des protéines solubles. Ceci a donc amené de nombreux chercheurs à essayer de découvrir une méthode de dissolution de la fibre qui soit suffisamment douce, - et c'est là le point essentiel - pour ne pas provoquer une rupture des liaisons peptidiques.

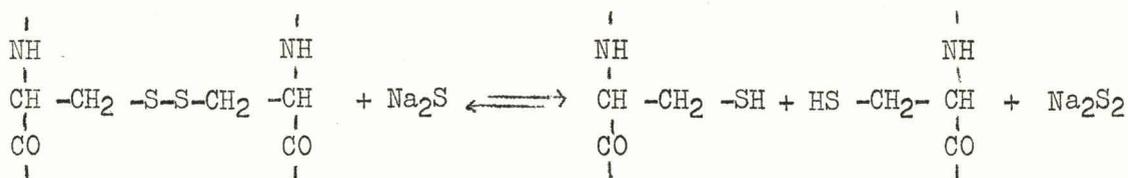
---

(+) Le terme " polypeptide " utilisé ici est inexact, puisque certains des fragments isolés ont des poids moléculaires qui dépassent très largement les poids moléculaires limites des polypeptides (8.000 à 10.000). Le terme " protéine " est également inexact puisque ces fragments sont des produits obtenus par une dégradation plus ou moins poussée des protéines initiales de la fibre. Il semble seulement commode de conserver les termes " polypeptides " et " protéine " pour éviter l'emploi de périphrase.

L'insolubilité de la kératine dans les solvants polaires est attribuée essentiellement au pontage des différentes chaînes polypeptidiques par les liaisons disulfures de la cystine. La kératine peut ainsi être comparée aux macromolécules synthétiques, qui deviennent insolubles lorsque les chaînes sont pontées de façon à former des réseaux bi-ou-tri-dimensionnels; les techniques de solubilisation de la laine visent donc toutes à rompre les liaisons disulfures, soit par réduction, soit par oxydation. La laine réduite n'est cependant pas soluble dans l'eau, mais dans des solutions aqueuses concentrées d'urée, de phénol, de thiocyanate, de détergents anioniques, etc.. La nature de ces solvants indique que les liaisons hydrogène qui peuvent s'établir entre les différentes chaînes polypeptidiques par les groupements polaires des aminoacides et les groupements -CO - NH des liaisons peptidiques, doivent également être coupées pour que la protéine puisse se solubiliser.

a) Solubilisation par des solutions de sulfures alcalins.

La réaction principale peut s'écrire :



REACTION - 1

JONES et MECHAM (1943) (45) ont montré que l'on pouvait dissoudre 70 % de la fibre dans une solution de sulfure de sodium 0,1/M, en 3 heures à 30°C, et que la " protéine " soluble pouvait être précipitée presque complètement par acidification à pH 4,2.

WARD et LUNDGREN (1954) (46) ont fait remarquer que la dispersion par les sulfures peut s'accompagner d'une hydrolyse des liaisons peptidiques, et que, vraisemblablement, les liaisons disulfures ne sont pas toutes coupées avec la même vitesse, puisque la quantité de " protéines " solubilisée, précipitable par acidification, diminue avec l'augmentation du temps de traitement ou avec des concentrations plus élevées en sulfure. Ceci explique que OLOFSSON et GRALEN (1947-1948) (47) n'aient trouvé qu'un poids moléculaire compris

entre 8.000 et 10.000, pour la " protéine " solubilisée par une solution de sulfure de sodium (3.5 M) agissant sur la laine, à pH 11; ce poids moléculaire tombant à 3.500 si la " protéine " était conservée deux mois dans le solvant.

Il est intéressant de signaler que HAPPEY et WORMELL (1949) (48) ont obtenu des fibres artificielles de protéines régénérées, par traitement des déchets de laine avec une solution de sulfure de sodium, filage de la solution, précipitation de la kératine solubilisée et durcissement de celle-ci au formol.

b) Solubilisation par des solutions d'urée contenant du bisulfite ou d'autres réducteurs.

La laine est pratiquement insoluble dans les solutions d'urée, mais JONES et MECHAM (1943) (49) ont trouvé que l'on peut solubiliser 52 % de la laine dans une solution d'urée (10 M) contenant du bisulfite de sodium (0,3 M) à pH 7, agissant durant 18 heures à 40°C. Ils estiment que la dispersion de la kératine, dans ces conditions, est le résultat de réactions combinées de dénaturation et de réduction des liaisons disulfures, mais que l'hydrolyse des liaisons peptidiques doit être faible. Ce dernier point mérite cependant quelques réserves, puisque MIDDLEBROOK (1951) (50) a trouvé que le nombre de groupements  $\alpha$ -aminés terminaux libres, dosables par le dinitrofluorobenzène (voir plus haut), était doublé lorsqu'on traitait la laine par une solution d'urée et de bisulfite pendant 24 heures à pH 5 et à 40° C. Les poids moléculaires moyens des chaînes polypeptidiques de la kératine sont respectivement 60.000 et 30.000 (+) pour la laine intacte et la laine traitée à l'urée-bisulfite; ceci démontre donc que certaines liaisons peptidiques de la laine sont particulièrement fragiles, et qu'il faut en tenir compte dans l'interprétation des résultats de solubilisation.

---

(+) MIDDLEBROOK calcule le poids moléculaire de la chaîne polypeptidique à partir du poids minimum de laine qui contient 2 équivalents de sérine N-terminale. Il se réfère à la sérine et non à l'acide aspartique, car il y a moins de décomposition de la DNP-sérine au cours de l'hydrolyse.

Un autre point sur lequel il faut également attirer l'attention est la variabilité de la proportion de laine solubilisée suivant les expérimentateurs (voir tableau 4); la solubilisation par des solutions d'urée contenant du bisulfite ou d'autres réducteurs n'est jamais totale; les résultats obtenus pour la fraction soluble ne sont donc pas forcément valables pour l'ensemble de la fibre. L'étendue de la solubilisation et la valeur du poids moléculaire dépendent, évidemment, avant tout, du nombre de liaisons disulfures qui sont rompues durant le traitement; or les expérimentateurs n'ont généralement pas élucidé ce point.(+)

A la suite des travaux de JONES et MECHAN, plusieurs auteurs ont étudié les propriétés moléculaires des fractions solubilisées dans l'urée contenant des agents réducteurs.

MERCER et OLOFSSON (1951) (51) ont solubilisé environ 20 % d'une laine Lincoln dans une solution saturée d'urée (9.5 M) contenant 5 % de bisulfite de sodium, à pH 8, par chauffage à 50°C durant 24 heures. La solution était fortement polydispersée; la mesure des constantes de sédimentation (1.93 unités SVEDBERG) et de diffusion leur a permis de calculer que le poids moléculaire moyen était de 84.000. Le rapport frictionnel molaire est de 3.86, ce qui indique une molécule très dissymétrique, d'un rapport axial de 90/1. Lorsque la fraction extraite à l'urée est réduite par  $\text{SNa}_2$  à pH 12, son poids moléculaire tombe à 8.000; ce dernier est pratiquement identique à celui qu'ont trouvé OLOFSSON et GRALEN, pour des solutions de kératine de laine dans le sulfure de sodium. MERCER et OLOFSSON supposent que, pour des valeurs de pH élevées (11 à 12), toutes les liaisons disulfures sont rompues, ce qui ne serait pas le cas à pH 8; les molécules les plus grosses ( P.M.84.000) seraient formées par la réunion, grâce à des ponts difulfures, de polypeptides d'un poids moléculaire moyen de 8.000.

---

(+) SPEAKMAN et MENKART (1952) (52), puis VANOVERBEKE et MAZINGUE (1954)(53), ont montré que des laines traitées par des solutions alcalines et dont les ponts disulfures de la cystine ont été remplacés partiellement par les ponts thio-éther de la lanthionine, sont beaucoup moins solubles dans les solutions concentrées de phénol contenant du thioglycolate, que des laines dont les ponts disulfures sont intacts.

Il semble plus raisonnable d'admettre que les solutions fortement alcalines provoquent une hydrolyse des liaisons peptidiques.

WOODS (1952) (54) a utilisé la méthode de solubilisation de MERCER & OLOFSSON avec une laine Mérinos, et a obtenu une solubilisation de 30 % du poids de la fibre; il obtient une solubilisation du même ordre en opérant à pH 5,7 et à 50°C durant 2 jours; ceci indique que la solubilité augmente lorsque le pH augmente. De ses mesures de pression osmotique, WOODS a déduit que le poids moléculaire apparent de la " protéine " solubilisée était de 30.000; mais un tiers de celle-ci diffuse à travers la membrane de collodion; aussi le poids moléculaire moyen de la fraction diffusible est de 10.000, et celui de la fraction non-diffusible de 50.000. Pour cet auteur le rapport axial de la molécule serait de 10 à 16/1.

FRIEND et O'DONNEL (1953) (55) ont dissout 15 à 20 % d'une laine Mérinos de finesse 64's en la chauffant dans une solution d'urée ( 8 M) et de bisulfite (0.4 M) à 60°C durant 48 heures ( pH initial 5,6; pH final 7,8). Mais ils ont montré que l'on pouvait dissoudre jusqu'à 85 % de cette laine, dans le milieu urée-bisulfite, si l'on soumet en même temps la fibre à une désintégration mécanique, qui permet aux agents solubilisants de pénétrer beaucoup plus facilement dans le cortex. Ceci indique que l'insolubilité de la laine n'est pas uniquement en rapport avec sa structure chimique, mais également avec sa structure morphologique : non seulement il faut rompre les liaisons disulfures, mais il faut également affaiblir et briser les membranes de la cuticule et du cortex, pour que leurs contenus puissent se solubiliser.

Par des mesures de pression osmotique, FRIEND et O'DONNEL ont déterminé les poids moléculaires de la fraction soluble et trouvent des valeurs comprises entre 12.000 et 16.000. Il est important de faire remarquer qu'ils trouvent les mêmes poids moléculaires s'ils ont extrait 20 ou 70 % des " protéines " de la fibre, ce qui indique qu'il ne se produit aucun fractionnement durant le processus de solubilisation.

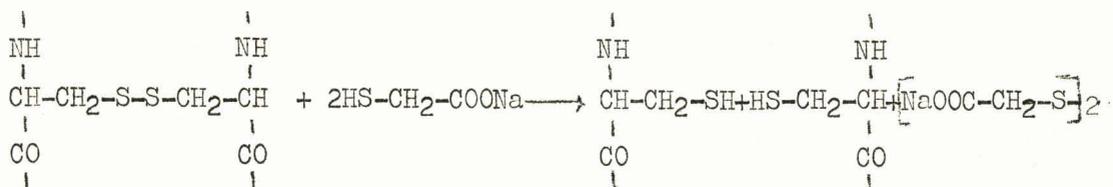
WARD (1952) (56) remplace le bisulfite par le mercaptoéthanol (alcool thioglycolique), qui est un agent plus efficace pour couper les liaisons disulfures. En une seule extraction, d'une durée de 19 heures, cet auteur arrive à solubiliser 63 % d'une laine Rambouillet dans une solution d'urée (10 M) contenant du mercaptoéthanol (0,5 M) et du chlorure de lithium (0,2 M)

(pH 8,7, température 50°C ). Le poids moléculaire de la "protéine" solubilisée, calculé à partir des constantes de sédimentation et de diffusion, est en moyenne de 14.000 et le rapport axial de 45/1. Pour des laines d'origine différente, les poids moléculaires s'échelonnent entre 12.700 et 13.800 (un seul échantillon a un poids moléculaire de 17.600). WARD a fait remarquer que la "protéine" soluble provient de l'intérieur de la fibre, car, même après plusieurs extractions, celle-ci présente toujours sous le microscope sa structure écaillée caractéristique.

O'DONNELL (1954) (57) a étudié les propriétés de solubilité d'une laine dont les liaisons disulfures ont été rompues au préalable. Il réduit celles-ci à pH 5,6 par une solution de thioglycolate de sodium et alkyle ensuite les groupements thiols par une solution d'iodoacétamide; après 10 réductions et alkylations successives, il obtient une laine dont tous les groupements disulfures sont remplacés par des groupements S-méthylène-carboxamide (-S-CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>). La laine ainsi modifiée est insoluble dans l'eau, mais une solution d'urée ( 8 M) à 40°C en dissout 80 % en 96 heures (avec agitation). La "protéine" extraite par l'urée se révèle comme très hétérogène à l'électrophorèse. Par ailleurs, si l'on élimine l'urée par dialyse, la "protéine " est partiellement soluble dans l'eau et les solutions légèrement alcalines; comme d'autre part la laine modifiée est insoluble dans ces conditions, O'DONNELL suppose avec MIDDLEBROOK que l'urée peut provoquer la rupture de certaines liaisons peptidiques. Le poids moléculaire de la "protéine " extraite par l'urée n'a pas été déterminé.

c) Solubilisation par des solutions de thioglycolate alcalin.

Le thioglycolate de sodium ( GODDARD et MICHAELIS) (1934) (58) peut réduire les liaisons disulfures de la laine d'après la réaction 2 :



Si le milieu est suffisamment alcalin, les chaînes polypeptidiques se solubilisent. GILLESPIE et LENNOX (1953 - 1955) (59) ont traité la laine par 30 fois son poids d'une solution de thioglycolate (0,1 M) à 50°C, durant 40 minutes, à différentes valeurs de pH. Au pH 10,5, 6 % seulement de la laine se solubilisent; au pH 12,6, au contraire, 65 % sont solubles, et 3% seulement de la protéine dialysent à travers une membrane de cellophane; au pH 13 enfin, 74 % de la kératine se solubilisent mais plus de la moitié de la fraction extraite dialyse : ce qui indique une coupure importante des liaisons peptidiques. L'agitation mécanique durant l'extraction augmente légèrement la quantité de protéine dissoute.

L'extrait à pH 12,6, dissous dans un tampon glycolle-thioglycolate (pH 11), a été soumis à l'électrophorèse dans l'appareil TISELIUS; il se révèle très hétérogène puisqu'il contient 7 composants mineurs et un composant majeur (composant 2) qui représente 41 % de la laine. Les composants mineurs peuvent être éliminés complètement de la laine en soumettant celle-ci à cinq extractions successives par du thioglycolate 0,1 M à pH 10,5. L'extraction du résidu à pH 12,3 donne le composant majeur à l'état pur : celui-ci se révèle alors homogène à l'électrophorèse. Une étude des cinétiques d'extraction montre que 70 % de la kératine de laine se solubilisent beaucoup plus rapidement que les 30 % restants, qui ne peuvent être solubilisés que par de la potasse 1 M; mais les extraits potassiques sont dialysables, ce qui indique une profonde altération des chaînes polypeptidiques.

HARRAP (1955) (60) a déterminé le poids moléculaire des différentes fractions extraites, par GILLESPIE et LENNOX, avec du thioglycolate : le poids moléculaire des fractions dialysables est de l'ordre de 10.000, celui des autres fractions, et notamment du composant majeur, de l'ordre de 30.000. Puisque FRIEND et O'DONNELL (1953) (61) ont trouvé un poids moléculaire de 15.000 pour la kératine extraite par l'urée et le bisulfite (voir plus haut), HARRAP émet l'hypothèse que le P.M. de 30.000 correspondrait à un "dimère" dont les deux moitiés seraient maintenues ensemble par des "liaisons hydrogène".

Le tableau 4 résume les résultats qui ont été obtenus par différents auteurs, sur le fractionnement de la laine en "polypeptides", par extraction avec des solutions réductrices d'urée, de sulfure de sodium ou de thioglycolate alcalin.

T A B L E A U - 4

Fractionnement de la laine en " polypeptides " par différentes techniques.

Auteurs	Na <sub>2</sub> S (M)	Urée (M)	SO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	Thiogly- colate (M)	Rapport laine/ solution	Tempé- rature	Durée de l'extrac- tion en h.	pH initial	laine solub. en %	P.M de la f.so- luble
Olofsson et Gralen (62)	3,5 <u>N</u>					20-22	48	11		8.000- 10.000
Jones et Mecham (63)	0,1					30°	3		70	
Jones et Mecham (64)		10	0,3 <u>M</u>		1/14	40°	18	7	52	
Mercer et Olofsson (65)		9,5	5 %			50°	24	8	20	84.000 (+)
Woods (66)		9,5	5 %		1/17	50°	24	8	30	
W (66)		8	4 %		1/6	50°	48	5,7	30	Dia. 10.000 Adia. 50.000
Friend et O'Donnel (67)		8	0,4 <u>M</u>		1/6	60°	48	5,6	15-20 85 av. agita- tion	12.000- 16.000
Ward (68)		10		0,5 <u>M</u> (++)	1/20	50°	19	8,7	63	14.000
Gillespie et Lennox (69)				0,1 <u>M</u>	1/30	50°	40	12,6	65	30.000 (+++)

(+) Si l'on réduit la fraction extraite par l'urée avec du sulfure de sodium à pH 12 son P.M = 8.000.

(++) Le thioglycolate a été remplacé par du mercaptoéthanol.

(+++) P.M. déterminé par Harrap.



d) Solubilisation après oxydation des liaisons disulfures.

DAS et SPEAKMAN (1950) (70) ont oxydé la laine par une solution de bioxyde de chlore (1,25 N) dans l'obscurité à 22°C. Environ 40 % de la protéine se dissout dans le réactif au bout de 120 heures, et si l'on plonge la laine oxydée dans l'eau bouillante, pendant une heure, la solubilisation totale s'élève à 87 %. Les poids moléculaires des fractions solubles dans la solution de bioxyde de chlore s'échelonnent de 2.000 à 12.000 (SPEAKMAN, 1949) (71); le résidu insoluble dans cette solution est au contraire soluble dans la cupriéthylènediamine, son poids moléculaire moyen est de 13.000, mais on peut en précipiter, par traitement à l'acide acétique, une fraction dont le poids moléculaire est de 36.000. SPEAKMAN (1952) (72) admet que le bioxyde de chlore hydrolyse certaines liaisons peptidiques, probablement celles des résidus tyrosine et proline.

TOENNIS et HOMILLER (1942) (73) ont montré que l'acide performique n'oxydait pas les amino-acides, à l'exception du tryptophane, de la méthionine et de la cystine, ce dernier composé étant oxydé quantitativement en acide cystéique. SANGER (1949) (74) a utilisé ce réactif pour couper les liaisons disulfures de l'insuline, sans modifier les autres amino-acides, et obtenir les deux chaînes polypeptidiques qui sont liées dans la molécule d'insuline par des ponts disulfures.

ALEXANDER, HUDSON et FOX (1950) (75) ont trouvé qu'une solution aqueuse à 1,6 % d'acide peracétique oxydait toute la cystine de la laine en 24 heures à 22°C. Durant le traitement avec la solution d'acide peracétique, aucune fraction protéinique de la fibre ne passe en solution.

Des expériences avec un certain nombre de peptides ont montré que l'acide peracétique n'attaquait par les liaisons peptidiques, du moins pendant la période de temps nécessaire à l'oxydation des liaisons disulfures (FOX 1951) (76). La laine oxydée par l'acide peracétique est soluble, sauf une fraction représentant 8 à 10 % de la fibre, dans de l'ammoniaque 0,1 N à froid (ALEXANDER et EARLAND, 1950) (77). Le résidu insoluble dans l'ammoniaque a été dénommé  $\beta$ -kératose par ALEXANDER, car il donne aux rayons X un diagramme de  $\beta$ -kératine; cet auteur considère que ce résidu, qui se présente au microscope sous forme d'une membrane, est la "subcuticule" de la fibre (voir chapitre 1). La fraction (90 à 92 % de la fibre) soluble dans

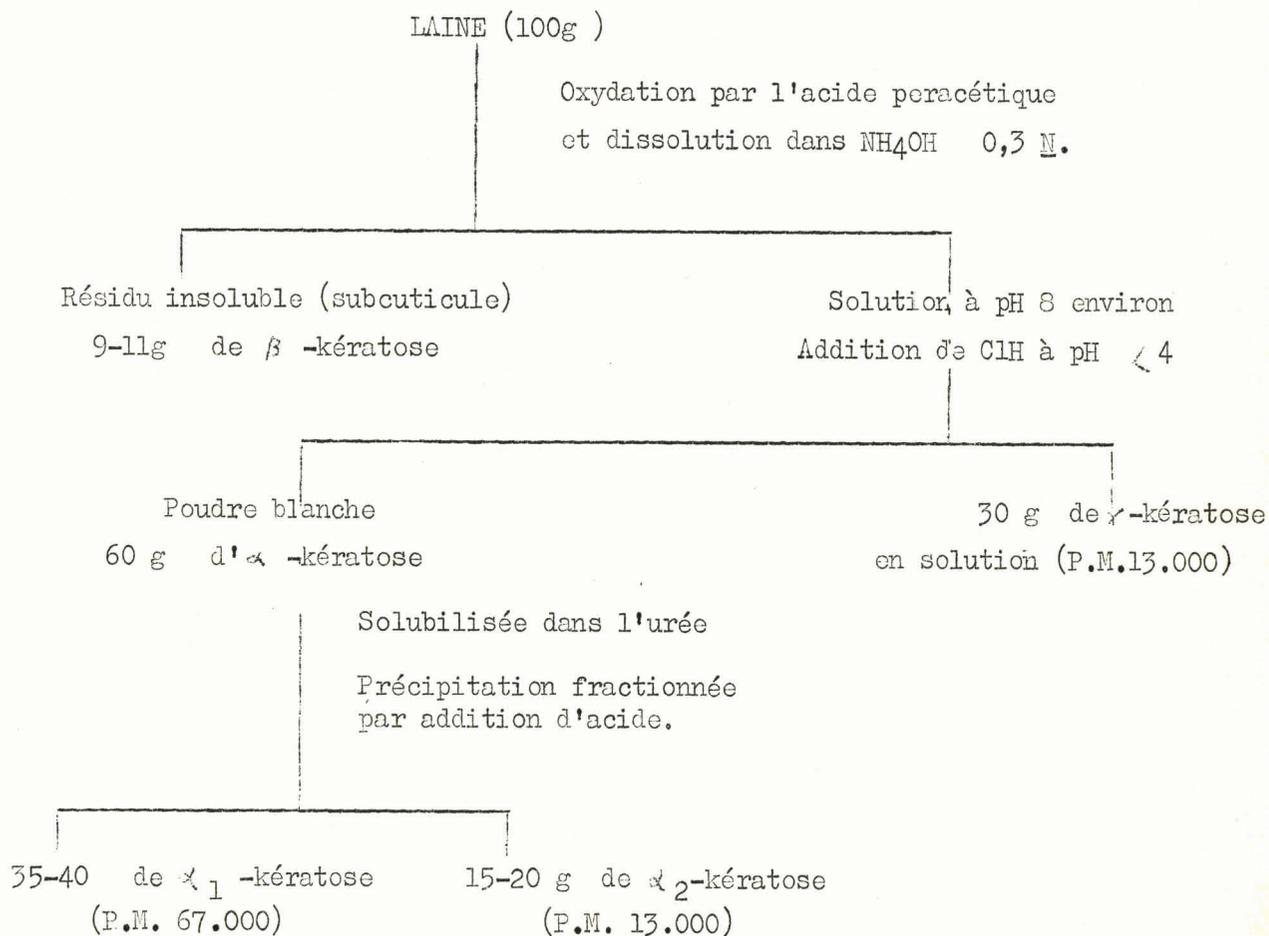
L'ammoniaque peut être séparée en deux fractions, appelées respectivement  $\alpha$  et  $\gamma$  -kératose. L' $\alpha$  -kératose, qui représente 50 à 60 % de la laine originelle, précipite lorsqu'on acidifie l'extrait ammoniacal à un pH inférieur à 4. Il donne aux rayons X un diagramme d' $\alpha$  -kératine. L'examen électrophorétique de l' $\alpha$  -kératose montre qu'il est formé de deux composants distincts; ces deux composants peuvent d'ailleurs être séparés, en dissolvant l' $\alpha$  -kératose dans une solution concentrée d'urée, et en ajoutant lentement de l'acide: l' $\alpha_1$ -kératose précipite d'abord, et donne un net diagramme de configuration  $\alpha$ ; l' $\alpha_2$ -kératose qui précipite ensuite, donne aux rayons X un diagramme mal défini.

La fraction de l'extrait ammoniacal qui reste soluble par acidification à pH 4, représente la  $\gamma$  -kératose; elle se révèle comme hétérogène à l'électrophorèse. Les constantes de sédimentation et de diffusion de ces différentes fractions ont été déterminées, et à partir de celles-ci, on peut calculer les poids moléculaires et la forme des molécules en solution. Les poids moléculaires trouvés sont respectivement : 67.000 pour l' $\alpha_1$  -kératose, 13.000 pour l' $\alpha_2$ -kératose et la  $\gamma$  -kératose; mais ces deux dernières fractions sont vraisemblablement formées par un mélange de très petites molécules, et de molécules dont le poids moléculaire pourrait atteindre un maximum de 15.000 (ALEXANDER) (78).

Le tableau 5 représente le fractionnement de la laine oxydée par l'acide peracétique.

TABLEAU 5

Fractionnement, en différents "polypeptides", de la laine oxydée par l'acide peracétique. D'après ALEXANDER (79).



3) Nouvel aspect de l'hétérogénéité de la fibre de laine : la structure bilatérale du cortex.

En 1953, HORIO et KONDO (80) ont montré, par une technique de teinture-différentielle, que le cortex des fibres de laine est formé de deux héli-cylindres, dont l'un est plus accessible aux colorants (segment D.A.) que l'autre (segment non-D.A.) (+); cette structure bilatérale s'étend tout au long de la fibre depuis la racine jusqu'à la pointe. Les deux segments s'enroulent l'un autour de l'autre, et suivent exactement la courbe correspondant à la frisure naturelle de la fibre, de sorte que le segment DA est toujours placé à l'extérieur de la courbure et le segment non-DA à l'intérieur ( voir figure 4). MERCER (1953) (81) a confirmé les observations de HORIO et KONDO, par une série de traitement physico-chimiques : il a notamment montré qu'en soumettant de la laine " supercontractée " à une hydrolyse tryptique, on obtenait un résidu inattaquable par l'enzyme, formé d'un tube dérivé de la cuticule, et renfermant à l'intérieur le " paracortex ". MERCER a en effet proposé d'appeler " paracortex " la partie du cortex la plus stable (segment non-DA de HORIO et KONDO), et " orthocortex " la partie la moins stable.

MERCER, GOLDEN et JEFFRIES (1954) (82) ont traité la laine par de l'acide thioglycolique à pH 4,5 pendant 8 heures : ce traitement, d'après PHILLIPS (1946) (83), provoque la réduction de la moitié seulement de la cystine de laine (fraction A + B) (voir plus loin). Ils ont ensuite traité cette laine réduite par le bromure d'éthyle, dans un milieu tampon de pH 8, de façon à éthyler les groupements thiols, et ils ont soumis la laine ainsi modifiée à une hydrolyse pepsique (pH 2, 40°C ) pendant une semaine. Des examens microscopiques, au cours de la digestion, leur ont permis de voir que l'attaque commençait d'un seul côté de la fibre, et que le cortex de ce côté était digéré lentement : il reste finalement un segment biréfringent, inattaquable par l'enzyme : le paracortex. La teneur en cystine de ce résidu est près du double de celle de la fraction hydrolysable: l'orthocortex. Ces expériences

---

(+) D.A est l'abréviation de dye-accessible.

amènent MERCER et ses collaborateurs à penser que le cortex de la fibre de laine serait formé de deux types différents de kératine : une kératine plus stable ( le paracortex ), car riche en liaisons disulfures, et une kératine moins stable ( l'orthocortex ), pauvre en liaisons disulfures; la répartition des autres amino-acides est également différente dans les deux fractions ( voir plus haut).

PHILLIPS a montré que la cystine pouvait être divisée en deux fractions, de réactivité différente ( voir plus loin), et pense que ces différences peuvent être dues à un environnement moléculaire différent des résidus de cystine. MERCER et ses collaborateurs suggèrent que des facteurs morphologiques sont également en cause : la fraction la plus réactive de PHILLIPS (fraction A + B) ferait essentiellement partie de l'orthocortex, et la moins réactive du paracortex.

Par ailleurs, MERCER et Coll. (1954) (84) ont observé au microscope optique que la protéine de laine ( 25 % ) soluble dans une solution d'urée-bisulfite ( pH 3 ) provient de l'orthocortex, et que le résidu insoluble est formé de la cuticule, des membranes des cellules corticales et du paracortex.

Peu de temps après la publication de HORIO et KONDO, deux chercheurs australiens, FRASER et ROGERS (1953) (85), ont signalé que la solubilisation de la laine par le thioglycolate alcalin suivant la technique de GILLESPIE et LENNOX (1953) (86) permettait également de montrer que le cortex est formé de deux composants bien définis, de réactivité chimique différente : la partie la plus soluble de la fibre vient du segment S ( orthocortex de MERCER) et le composant électrophorétiquement homogène du segment H ( paracortex de MERCER).

Récemment FRASER et ROGERS (1955) (87) ont montré que certaines propriétés physiques et chimiques de la fibre de laine étaient en relation avec la structure bilatérale du cortex. Ils ont discuté de l'origine de cette asymétrie et montré, par des techniques histologiques (teintures avec des colorants basiques), que cette structure bilatérale existe dans le cortex avant la kératinisation et ne provient donc pas d'une kératinisation asymétrique survenant dans les follicules de la peau des moutons, comme le suggère MERCER (1953) (88).



FIGURE - 4

Paracortex de la fibre.

Beaucoup plus résistant vis-à-vis des agents chimiques, le paracortex subsiste après 5 minutes de contact avec de la soude à 6,5 % à la température du laboratoire. Le paracortex est visible à l'intérieur des fibres.

(Photo extraite de l'article de WARD et LUNDGREN, *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 1X, 1954 et reproduite avec l'autorisation des Editeurs ).

4) La composition en amino-acides des différents éléments constitutifs de la fibre de laine.

Quelques essais ont été réalisés pour déterminer la composition en amino-acides des différentes fractions de la laine. Les résultats les plus intéressants sont réunis dans le Tableau 6. Mais il faut rappeler de nouveau que l'interprétation de ces résultats, en ce qui concerne l'hétérogénéité de la laine, est difficile, car toutes les méthodes de fractionnement utilisent des procédés qui dégradent plus ou moins les molécules de kératine originellement présentes dans la fibre. Par ailleurs ces résultats ont été obtenus avec des techniques analytiques qui ne sont pas d'une très bonne précision.

T A B L E A U 6

( voir page suivante )

T A B L E A U 6

Composition en amino-acides des composants de la laine en grammes pour cent grammes de laine.

Composants	Cellu- les fusi- formes (+)	Cuti- cule	Cellu- les fusi- formes (++)	Epicu- ticule	Membra- nes des cellu- les +épi- cuticu- le	Para - cortex + Epi- cuticu- le	Ortho- cortex	$\alpha$ - Kéra- tose
Référence	WARD (89)	WARD (89)	LINDLEY (90)	GOLDEN (91)	GOLDEN (91)	GOLDEN (91)	GOLDEN (91)	GOLDEN (91)
Azote total	16,1	16	14,5					
Soufre -	3,63	1,14	7,5					
<u>Amino-acides</u>								
Alanine	3,6	4,5	3,0	0,3	1,6	1,3	1,9	1,1
Arginine	10,1	7,9	7,0	3,2	11,2	15,6	6,6	10,8
Ac. Aspartique	7,2	4,8		24,7	3,9	5,0	12	8,1
Cystine	10,6	-	25,2	13,5	6,1	17,1	9,8	13,3
Ac. Glutamique	16,5	13		27,7	11,1	14,0	18,6	16,5
Glycocolle	3,6	4,0		0,7	3,2	2,7	9,1	6,7
Histidine								
Isoleucine	4,0	3,1						
Leucine	9,0	7,2	4,9	0,8	6,2	8,7	7,6	6,8
Lysine	3,6	3,6		1,4				
Méthionine								
Phénylalanine	2,9	2,2	1,2	0,3	1,5	1,9	1,5	1,1
Proline	6,6	8,5	9,1	2,5	5,6	5,6	8,0	6,3
Sérine	7,5	9,8		5,8	5,4	10,5	10,0	10,3
Thréonine				2,0	2,1	5,6	8,2	6,6
Tryptophame								
Tyrosine	4,2	3,2	2,4					
Valine			4,2	2,1	1,7	2,4	4,0	1,9

(+) Les cellules fusiformes sont obtenues de la façon suivante : 100 g de laine sont traités pendant 48 heures à 25°C par 3 litres de ClH 6N . Le résidu insoluble est lavé à l'eau et broyé dans un moulin; il est mis ensuite en suspension dans l'eau; la fraction qui se dépose est formée de cellules fusiformes.

(++) LINDLEY obtient des cellules fusiformes par hydrolyse partielle de la laine avec l'acide cétylsulfonique (0,05 N ) durant 6 jours à 65°C.



## 5) Conclusions.

Etant donné l'impossibilité d'isoler les constituants morphologiques sans modifier plus ou moins leur structure chimique, on ne peut actuellement affirmer, bien que cela soit vraisemblable, que chaque constituant (épicuticule, cuticule, subcuticule) est formé d'une protéine différente. Il est d'ailleurs possible que chaque constituant soit un mélange de kératines de structures plus ou moins voisines.

Il est également difficile de se prononcer sur la structure macromoléculaire de ces protéines. En effet, la mise en solution de celles-ci n'est possible qu'après rupture des liaisons disulfures; or, il peut se produire, au cours du traitement, une hydrolyse plus ou moins poussée des liaisons peptidiques.

Si la détermination des groupements  $\alpha$ -aminés terminaux libres permet d'affirmer que la laine contient un certain nombre de chaînes polypeptidiques différentes, on ne peut savoir si toutes ces chaînes font partie de la même protéine ou de protéines différentes.

La détermination des poids moléculaires des fractions solubilisées n'apportent pas non plus de conclusions définitives sur la longueur des chaînes polypeptidiques. Les fragments les plus gros qui ont été isolés ont des poids moléculaires de l'ordre de 70.000, mais il est possible qu'ils contiennent encore des liaisons disulfures intactes, - ou peut-être d'autres liaisons covalentes, - qui réunissent deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques. L'analyse quantitative des groupements  $\alpha$ -aminés terminaux permet de calculer que le poids moléculaire moyen d'une chaîne est de 60.000 (MIDDLEBROOK); mais la solubilisation par l'urée-bisulfite, qui semble être le moyen le plus doux que l'on puisse utiliser, fournit des protéines d'un poids moléculaire moyen de 30.000.

Quant aux fractions de poids moléculaire 4.000 à 10.000, isolées par différents auteurs (ALEXANDER, OLOFFSON et GRALEN), elles peuvent être des polypeptides de faible poids moléculaire constituant le "Ciment intercellulaire" ou tout simplement des produits d'hydrolyse des grosses chaînes polypeptidiques.

E - La réactivité des liaisons disulfures.

Les propriétés physico-mécaniques de la fibre de laine : élasticité, supercontraction, ténacité à la traction, insolubilité, etc., sont de la plus haute importance du point de vue de l'industrie textile. Or, ces propriétés sont évidemment conditionnées par la structure macromoléculaire de la protéine - ou des protéines - constituant la fibre. Les liaisons disulfures de la cystine, qui peuvent réunir les différentes chaînes polypeptidiques, jouent donc un rôle important dans la structure de la fibre, et il est du plus grand intérêt de connaître la réactivité de ces liaisons vis-à-vis des réactifs chimiques. En effet, les traitements industriels, tels que le lavage, le fixage, le blanchiment, la teinture, etc., exécutés dans des conditions trop brutales, peuvent modifier les liaisons disulfures, et ceci se traduit toujours par une diminution des qualités textiles de la fibre.

Les travaux les plus importants, qui ont été réalisés sur la réactivité des liaisons disulfures de la laine, sont d'une part ceux de PHILLIPS et de ses collaborateurs, qui ont étudié l'action des agents réducteurs et des alcalins sur la laine, d'autre part ceux d'ALEXANDER et de ses collaborateurs, qui ont étudié l'action des agents oxydants.

1) Les travaux de PHILLIPS : La classification de la cystine de la laine en fractions de réactivité chimique différente.

PHILLIPS et ses collaborateurs ont examiné le comportement de laines intactes et de laines modifiées chimiquement, vis-à-vis de solutions de sulfite de sodium, d'alcalis, de cyanure de potassium, de formol et d'acide thioglycolique. Leur méthode consiste à doser par la technique colorimétrique de SHINOHARA (+) (1935) (92), d'une part le soufre disulfure

---

(+) La technique de SHINOHARA est exposée en détail dans la 2ème partie, Chapitre 1, elle comprend deux opérations bien distinctes :

- 1) Hydrolyse de la laine par l'acide chlorydrique 5,6 N bouillant.
- 2) Dosage, dans cet hydrolysate, de la cystine et de la cystéine, par mesure de la coloration bleue que donnent ces composés avec l'acide phosphotungstique.

( Cystine ) préexistant dans la laine, et d'autre part le soufre disulfure restant et le soufre thiol apparu ( Cystéine) dans les laines ayant été soumises, dans des conditions variées, à l'influence de ces réactifs ( ELSWORTH et PHILLIPS , 1933 (93), 1941 (94); MIDDLEBROOK et PHILLIPS, 1942 (95), 1947 (96); CUTHBERTSON et PHILLIPS, 1945 (97); LINDLEY et PHILLIPS, 1945 (98), 1947 (99); CARTER, MIDDLEBROOK et PHILLIPS, 1946 (100).

PHILLIPS (1946) (101) a résumé les résultats de l'ensemble de son expérimentation dans le tableau suivant:

T A B L E A U 7

( voir page suivante)

T A B L E A U 7

La subdivision de la cystine de la laine en quatre sous-fractions

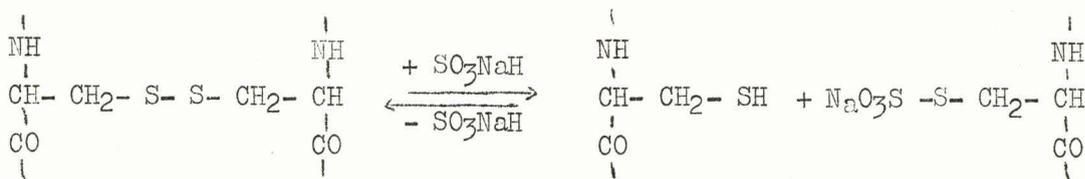
<p>Laine :</p> <p>Fraction (A+B): S-cystinique 1,8 %</p> <p>1) Réactivité vis-à-vis de <math>\text{SO}_3\text{Na H}</math>.</p> <p>La sous-fraction A (0,8 %) réagit en donnant des groupements -SH hydrolysables par l'eau, et des groupements - <math>\text{CH}_2\text{-S-SO}_3\text{ Na}</math>.</p> <p>La sous-fraction B (1 %) donne des groupements - SH stables à l'eau et des groupements - <math>\text{CH}_2\text{-S-SO}_3\text{Na}</math>.</p> <p>11) Réactivité vis-à-vis des alcalis.</p> <p>La fraction (A+B) est transformée en lanthionine.</p> <p>La sous-fraction A réagit plus rapidement que la sous-fraction B</p> <p>111) Réactivité vis-à-vis du formol.</p> <p>La sous-fraction A ne réagit pas</p> <p>La sous-fraction B donne de l'acide thiazolidine-4-carboxylique.</p> <p>1V) Réactivité vis-à-vis de <math>\text{HS-CH}_2\text{-COOH}</math></p> <p>Les sous-fractions A et B sont réduites à pH 4,5. Avec le formol, la sous-fraction A donne de l'acide djenkolique, la sous-fraction B donne de l'acide thiazolodine-4-carboxylique.</p> <p>La sous-fraction A ne réagit pas avec <math>\text{CH}_2\text{Br}_2</math>.</p> <p>La sous-fraction B ne réagit pas.</p>	<p>Soufre cystinique 3,6 %</p> <p>Fraction (C+D) : S-cystinique 1,8 %</p> <p>La sous-fraction C (0,8 %) ne réagit pas.</p> <p>La sous-fraction D (1,0 %) se décompose dans le bisulfite bouillant en donnant de l'acide <math>\alpha</math>-aminoacrylique combiné.</p> <p>Les fractions (C+D) donnent de l'acide <math>\alpha</math>-aminoacrylique combiné : la sous-fraction C réagit plus lentement.</p> <p>Pas de réaction.</p> <p>Les sous-fractions C et D sont réduites beaucoup plus lentement à pH 4,5</p> <p>Après réduction ces sous-fractions ne réagissent pas avec le formol et le dibromure de méthylène.</p>
---	---



L'examen de ce tableau montre que la cystine de la laine peut être divisée en deux fractions égales. Ces deux fractions principales diffèrent essentiellement par le fait qu'elles donnent naissance à des produits distincts, lorsque la laine est soumise à l'action d'un réactif donné: ainsi, sous l'influence des alcalis, la cystine de la fraction ( A+B ) se transforme en lanthionine, et celle de la fraction ( C+D ) en acide  $\alpha$  -aminoacrylique. Chacune de ces fractions peut à son tour être divisée en deux sous-fractions qui ont des propriétés semblables, mais qui diffèrent surtout entre elles par la vitesse avec laquelle elles réagissent: les alcalis transforment rapidement la fraction A en lanthionine, et lentement la fraction B.

a) Réaction de la cystine de la laine avec le bisulfite de sodium.

Au pH 5, qui est le pH optimum d'action, et à la température ordinaire (22°C), la moitié seulement de la cystine de la laine (fraction A+B) réagit avec le bisulfite de sodium, en donnant de la cystéine et de la S-cystéine-sulfonate de sodium, qui restent combinées dans la protéine (réaction 3 lue de gauche à droite ).

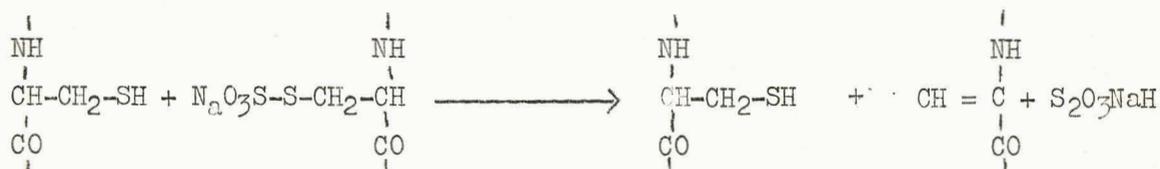


REACTION - 3

Cette fraction peut être subdivisée en 2 sous-fractions A et B, car les groupements thiols et S-cystéine-sulfonate, apparus dans la laine, n'ont pas tous la même stabilité vis-à-vis de l'eau. En effet, si l'on rince abondamment la laine traitée au bisulfite, un peu moins de la moitié de ces groupements -SH et -S-SO<sub>3</sub>Na reforment des liaisons disulfures ( réaction 1 lue de droite à gauche). La cystine de la sous-fraction A (0,8 % du soufre) donne donc naissance à des groupements thiols et S-cystéine-sulfonate de sodium labiles vis-à-vis de l'eau, tandis que celle de la sous-fraction B ( 1 % du soufre) donne naissance à ces mêmes groupements, mais ceux-ci sont stables vis-à-vis de l'eau.

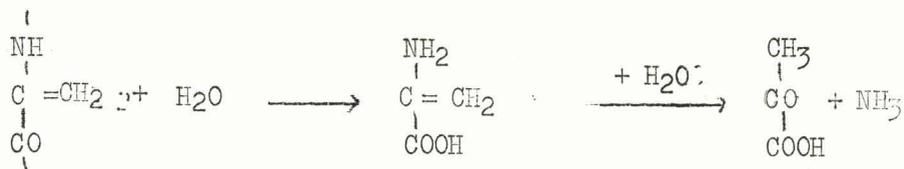
PHILLIPS a fait remarquer que le rapport entre les sous-fractions A et B dépendait de la méthode de rinçage. FARNWORTH (1955) (102), qui a repris les expériences de PHILLIPS, a montré que dans certains cas la sous-fraction A représente 1,52 % du soufre disulfure, ce qui indique que si la moitié des liaisons disulfures de la laine peuvent être coupées par des solutions froides de bisulfite, ces liaisons ont une tendance très nette à se reformer lorsqu'on enlève la laine du milieu réducteur.

Quant à la deuxième moitié de la cystine (fraction C+D) elle ne réagit que dans des conditions plus violentes : augmentation de la concentration de la solution de bisulfite, durée plus longue du traitement, température plus élevée ( au dessus de 40° C). Dans ces conditions une certaine quantité de cystine ( fraction C) ne réagit cependant pas avec le bisulfite, puisque les laines traitées contiennent encore du S-disulfure, et il est probable que la sous-fraction D se décompose en acide  $\alpha$  -aminoacrylique, qui reste combiné dans la laine, et en hyposulfite qui est libéré. PHILLIPS suppose que la sous-fraction D réagit d'abord suivant la réaction 3 et qu'ensuite les groupements thiols et S-cystéine-sulfonate de sodium se décomposent suivant la réaction 4.



REACTION - 4

Il appuie cette hypothèse sur le fait que les hydrolysats chlorhydriques de laine traitée par des solutions chaudes de bisulfite contiennent un peu d'acide pyruvique. La présence de ce composé s'expliquerait par l'hydrolyse de l'acide  $\alpha$  -aminoacrylique combiné ( réaction 5).



REACTION - 5

La quantité d'acide pyruvique dosé ne correspond toutefois pas à la quantité théorique d'acide  $\alpha$ -aminoacrylique qui peut apparaître, par décomposition de la cystine suivant les réactions 3 et 4; PHILLIPS suppose donc que l'acide  $\alpha$ -aminoacrylique peut se transformer ensuite en un composé plus stable: sans doute la lanthionine (+)(réaction 6).



REACTION - 6

En résumé, l'action du bisulfite de sodium sur la laine permet de classer la cystine en 2 fractions égales de réactivité différente :

1) Une fraction (A + B) très réactive: les liaisons disulfures de cette fraction sont coupées par des solutions diluées et froides de bisulfite, mais une partie de ces liaisons disulfures ont tendance à se reformer lorsque la laine " bisulfitée " est plongée dans l'eau.

2) Une fraction (C + D) beaucoup moins réactive : elle réagit avec des solutions chaudes pour donner d'une façon irréversible des produits de décomposition de la cystine, - vraisemblablement l'acide  $\alpha$ -aminoacrylique.

---

(+) On peut faire remarquer que si PHILLIPS ne retrouve pas la quantité théorique d'acide pyruvique qui devrait apparaître d'après les réactions 3, 4 et 5, c'est que cet acide doit se décomposer en grande partie, lors de l'hydrolyse de la laine qui précède le dosage.

Dans toute la suite de leur expérimentation, PHILLIPS et ses collaborateurs se sont fondés sur ce critère très simple, - la réactivité à froid de la fraction ( A+B ) avec le bisulfite de sodium, - pour reconnaître quelle est la fraction de la cystine qui réagit avec les différents réactifs : alcalis, formol, acide thioglycolique.

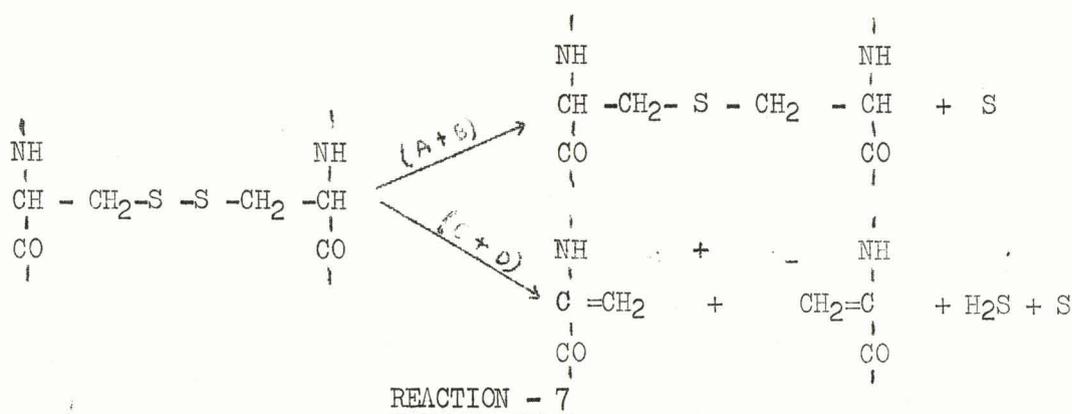
Quant aux sous-fractions, - qui sont d'ailleurs moins nettement définies, puisque le rapport des sous-fractions A et B peut varier - , elles sont classées de la façon suivante :

- 1) La sous-fraction A est celle qui donne avec le bisulfite de sodium froid des groupements - SH et - S- SO<sub>3</sub>Na qui, dans l'eau, reforment des liaisons disulfures.
- 2) La sous-fraction B est celle qui donne des groupements - SH et - S-SO<sub>3</sub>Na stables dans l'eau.
- 3) La sous-fraction C ne réagit pas avec le bisulfite.
- 4) La sous-fraction D se décompose dans le bisulfite concentré et chaud.

b) Réaction de la cystine de la laine avec les alcalis.

Cette étude présente un intérêt particulier, étant donné les nombreux traitements industriels de la laine qui s'effectuent en milieu alcalin; aussi, PHILLIPS et ses collaborateurs ont étudié systématiquement l'action de solutions bouillantes de tampons de différents pH ( 7 à 10) et de solutions froides de soude ( N/10, N/100 ) sur la laine ( CUTHBERTSON et PHILLIPS, 1945) (103), (LINDLEY et PHILLIPS, 1945 ) (104).

Ils sont arrivés à la conclusion suivante : sous l'influence des alcalis, la fraction ( A + B) de la cystine se transforme en lanthionine, et la fraction (C+D) en acide  $\alpha$  -aminoacrylique ( réaction 7).



Les sous-fractions A et D se distinguent des sous-fractions B et C par une plus forte réactivité.

La présence de lanthionine dans la laine traitée par les alcalis est un fait bien établi expérimentalement; HORN, JONES et RINGEL (1941) (105) ont en effet isolé cet amino-acide, de l'hydrolysât chlorhydrique d'une laine qui avait subi l'action d'une solution bouillante de carbonate de sodium. CUTHBERTSON et PHILLIPS, en utilisant la même méthode, ont pu isoler la lanthionine à partir d'une laine qui avait été bouillie dans une solution de très faible alcalinité ( pH 8 ).

L'évaluation de la proportion de cystine ( 50 % ) capable d'être transformée en lanthionine, résulte d'une analyse complète du soufre sous ses différentes formes, dans les laines traitées et dans la laine non traitée.

Le soufre de la lanthionine s'obtient en effet en soustrayant du soufre total le soufre thiol, le soufre disulfure, le soufre de la méthionine, et le soufre oxydable par le brome.

Lorsqu'on soumet la laine à des traitement alcalins de plus en plus sévères, et que, par conséquent, la quantité de lanthionine dans la laine augmente, on peut montrer que la quantité de cystine capable de réagir avec le bisulfite de sodium froid diminue progressivement : ceci démontre que la cystine transformable en lanthionine est bien la même que celle qui agit avec le bisulfite, c'est-à-dire la fraction ( A + B ).

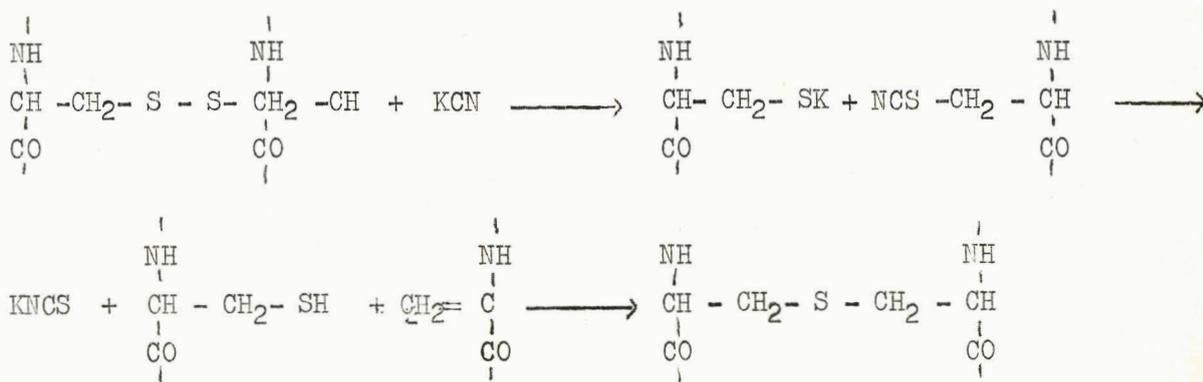
Puisque, sous l'influence des alcalis, la laine peut perdre une quantité de soufre supérieure à la quantité de soufre de la lanthionine apparue

et que les hydrolysats de laines traitées contiennent jusqu'à 1,54 % d'acide pyruvique (réaction 5), PHILLIPS suppose que la fraction (C+D) de la cystine se transforme en acide  $\alpha$  -aminoacrylique (+).

BERGMANN et STATHER (1926) (106) ont d'ailleurs trouvé que le dianhydride de la dialanycystine, traité par les alcalis, donnait de l'acide  $\alpha$  -aminoacrylique. Il n'a cependant jamais été possible de transformer un dérivé simple de la cystine en lanthionine sous l'influence des alcalis, ce qui montre que les liaisons disulfures de la laine peuvent réagir d'une manière très différente des liaisons disulfures de l'acide-amino lui-même.

c) Réaction de la cystine de la laine avec le cyanure de potassium.

Les liaisons disulfures de la cystine de la laine sont presque quantitativement transformées en lanthionine, par traitement avec une solution à 1 % de cyanure de potassium (durée 16h, température 66°C). CUTHBERTSON et PHILLIPS (1945) (108) ont proposé le mécanisme suivant (réaction 8).



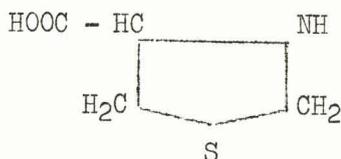
REACTION - 8

(+) Dernièrement, BLACKBURN et LEE (1956) (107) ont trouvé que dans la laine traitée à l'ébullition par des tampons alcalins, il y a, en plus d'une destruction appréciable de la cystine, une légère destruction de la sérine et de la thréonine. L'acide pyruvique, trouvé dans les hydrolysats de laines traitées par les alcalis, pourrait donc provenir de la décomposition de l'acide  $\alpha$  -aminoacrylique formé par l'action des alcalis sur la sérine.

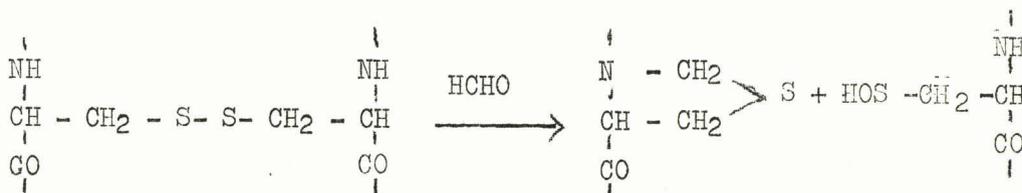
Toutes les liaisons disulfures peuvent donc être transformées en liaisons thioéthers par le cyanure de potassium, alors que la moitié seulement réagit de cette façon avec les alcalis.

d) Réaction de la cystine de la laine avec le formol.

La cystine de la laine ne réagit pas avec des solutions de formol à température ordinaire. Au contraire, quand la laine est traitée à 70° C avec des solutions de formol de pH 5 à 7, elle ne donne plus, ensuite, avec le bisulfite de sodium froid des groupements - SH et - S-SO<sub>3</sub>Na stables vis-à-vis de l'eau : MIDDLEBROOK et PHILLIPS (1942) (109) en déduisent que c'est la sous-fraction B de la cystine qui a réagi avec le formol. Dans l'hydrolyse chlorhydrique de la laine formolée, ils ont mis en évidence par chromatographie sur papier l'acide thiazolidine-4-carboxylique.



Ces auteurs proposent donc le mécanisme suivant pour expliquer l'action du formol sur la cystine de la laine ( réaction 9).



REACTION - 9

La réaction du formol avec la sous-fraction B est d'ailleurs réversible : en effet, si l'on fait bouillir la laine formolée avec une solution d'acide phosphorique, on retrouve la même quantité de soufre disulfure que dans la laine non traitée par le formol.

MIDDLEBROOK et PHILLIPS (1947) (110) ont également étudié l'action de solutions bouillantes de formol, à différents pH, sur la cystine de la laine. Pour des valeurs de pH de 1, 6, 7 et 10, la sous-fraction B réagit en donnant de l'acide thiazolidine-4-carboxylique (réaction 9), tandis que la sous-fraction A ne réagit qu'à pH 10 et donne de la lanthionine (+).

e) Réaction de la cystine de la laine avec l'acide thioglycolique.

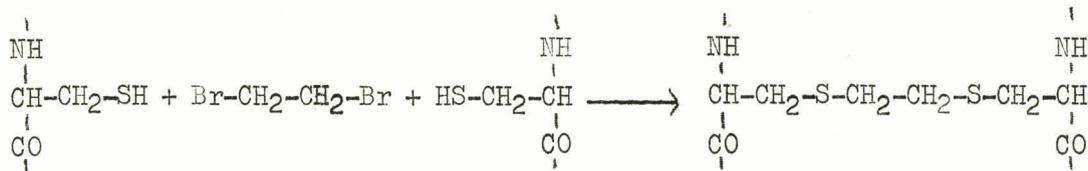
Les solutions alcalines de thioglycolate réduisent les liaisons disulfures et dissolvent partiellement la laine (GODDARD et MICHAELIS, 1934) (111), tandis que des solutions d'acide thioglycolique provoquent simplement une réduction partielle de la cystine. MIDDLEBROOK et PHILLIPS (1942) (112) ont montré qu'une laine traitée par une solution moléculaire d'acide thioglycolique (à pH 4,5 et 35°) contenait 1,89% de soufre thiol et que cette laine réduite ne réagissait plus avec des solutions froides de bisulfite de sodium : la fraction facilement réductible par l'acide thioglycolique est donc la fraction (A+B).

Après réduction de la fraction (A + B) par l'acide thioglycolique (réaction 10), les groupements thiols apparus peuvent réagir avec le formol ou le dibromométhane (++)

Avec le formol, la sous-fraction A est transformée en acide djenkolinique combiné (réaction 11) et la sous-fraction B en acide thiazolidine-4-carboxylique combiné (réaction 12). Au contraire avec le dibromométhane, seule la sous-fraction A réagit (réaction 13).

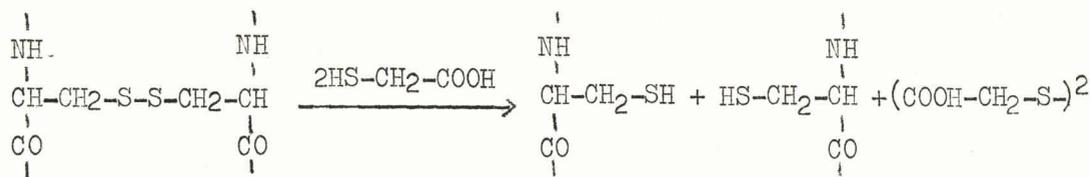
(+) En dehors de son action sur les liaisons disulfures, le formol peut réagir avec d'autres groupements de la protéine (voir plus loin).

(++) PATTERSON et HARRIS, GEIGER et HARRIS (1941, 1942) (113) ont montré qu'en traitant une laine réduite par le thioglycolate, avec des dérivés  $\omega$ ,  $\omega$ -dihalogénés, on pouvait remplacer les liaisons disulfures par d'autres liaisons plus stables (réaction 13).

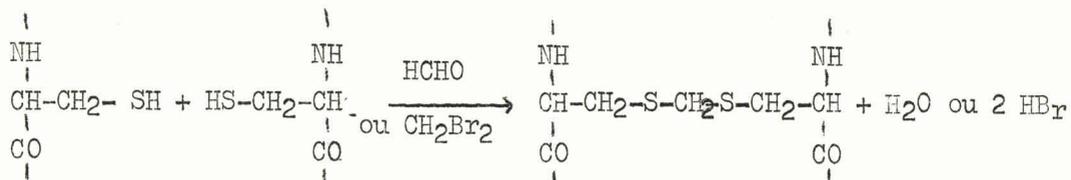


REACTION - 13

Les laines ainsi modifiées, sont plus résistantes que la laine non traitée vis-à-vis de réactifs chimiques, notamment les alcalis, les réducteurs et les oxydants : par ailleurs, elles sont attaquées beaucoup moins facilement par les microorganismes et les mites.



REACTION -10



REACTION -11



REACTION -12

L'acide djenkolique et l'acide thiazolidine-4-carboxylique ont été identifiés, par chromatographie sur papier, dans les hydrolysats de laines réduites par l'acide thioglycolique et traitées ensuite par le formol ou le dibromométhane (CONSDEN, GORDON, MARTIN, 1946) (114).

La fraction (C+D) est réduite beaucoup plus lentement à pH 4,5 par l'acide thioglycolique, mais après réduction cette fraction ne réagit pas avec le formol ou le dibromométhane.

2) Les raisons de la réactivité variable des liaisons disulfures de la laine.

La longue série des travaux de PHILLIPS et de ses collaborateurs montre donc que la cystine de la laine peut être classée en deux fractions principales, qui, non seulement ne réagissent pas avec la même vitesse, mais encore donnent naissance à des composés différents, sous l'action d'un même réactif.

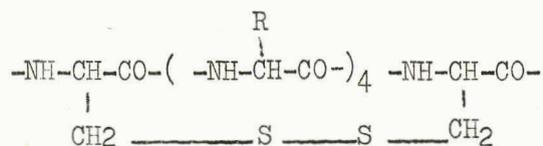
Pour essayer d'expliquer ceci, PHILLIPS - arguant de résultats expérimentaux, par ailleurs assez peu convaincants - , a émis l'hypothèse que cette réactivité variable dépendait de la nature des chaînes latérales qui environnent les liaisons disulfures : la fraction (A+B), la plus réactive, serait au voisinage de chaînes latérales polaires, tandis que la fraction (C+D) serait environnée par des chaînes latérales non polaires.

Dernièrement, FARNWORTH (1955) (115) a réexaminé certains points du travail de PHILLIPS, et montré que l'hypothèse précédente était insoutenable.

FARNWORTH a d'abord montré que la classification de la cystine en deux fractions nettement différentes n'est pas aussi nette que le croit PHILLIPS; on peut en effet amener la fraction (C+D) à réagir de la même façon que la fraction (A+B). Ainsi, si l'on réduit la fraction (A+B) par le bisulfite de sodium froid, et que l'on méthyle ensuite les groupements thiols apparus, pour rendre impossible la reformation des liaisons disulfures, la fraction C+D est alors également réductible par le bisulfite de sodium froid et donne naissance à des groupements  $-SH$  et  $-S-SO_3Na$  (réaction 3), et non pas à de l'acide  $\alpha$ -aminoacrylique (réaction 4). Au contraire, si l'on transforme la cystine de la fraction (A+B) en acide djenkolique (réaction 11) par réduction suivie de repontage avec  $CH_2I_2$ , la fraction (C+D) devient alors moins réactive que dans la laine non traitée.

Pour étudier l'influence que les groupements polaires pourraient éventuellement exercer sur la réactivité des liaisons disulfures, FARNWORTH a traité la laine avec de l'isocyanate de phényle, qui bloque à la fois les groupements basiques et les groupements acides des chaînes latérales : l'ensemble des liaisons disulfures d'une laine ainsi traitée ne sont plus réductibles par le bisulfite de sodium et ne donnent pas de lanthionine avec les alcalis. Ceci montre bien que l'environnement de la fraction (A+B) par des chaînes polaires, et celui de la fraction (C+D) par des chaînes non polaires, n'est pas la cause de la réactivité variable constatée pour ces deux fractions, car s'il en était bien ainsi, le blocage des groupements polaires par l'isocyanate de phényle ne devrait pas influencer la réactivité de la fraction (C+D), ce qui n'est pas le cas, puisque les deux fractions deviennent toutes deux non réactives. Ce dernier point suggère à FARNWORTH une autre hypothèse :

la cystine de la fraction (A+B) pourrait être combinée à des amino-acides à chaînes latérales ne provoquant qu'un faible encombrement stérique, tandis que celle de la fraction (C+D) serait au contraire au voisinage d' amino-acides dont les chaînes latérales provoquent un encombrement stérique important. Cette hypothèse permet d'expliquer les différences de réactivité entre les deux fractions; elle n'apporte cependant aucune explication au fait que les deux fractions peuvent réagir suivant des mécanismes différents pour donner des produits de décomposition différents. Ceci amène donc FARNWORTH à reprendre une hypothèse, - souvent émise, - qu'une partie de la cystine de la laine au lieu de ponter deux chaînes polypeptidique, pourrait donner des liaisons intrapeptidiques, comme celles qui ont été mises récemment en évidence dans l'ocytocine, la vasopressine et l'insuline.



On ne dispose cependant, à l'heure actuelle, d'aucun argument pour ou contre l'existence d'une telle structure dans la laine.

3) Les travaux d'ALEXANDER : Réaction de la cystine de la laine avec des agents d'oxydation.

De nombreuses études techniques, ayant trait à l'action des oxydants sur la laine, ont été entreprises en raison de l'importance industrielle de l'opération de blanchiment; par ailleurs une modification de la surface écailleuse de la fibre sous l'influence de certains agents d'oxydation la rend infeutrable, et cette qualité est très recherchée pour certains articles textiles.

ALEXANDER et ses collaborateurs ont étudié en détail la réactivité de la cystine ( également de la tyrosine) vis-à-vis du chlore, de l'acide hypochloreux, des hypochlorites alcalins, du permanganate et de l'acide peracétique. ( ALEXANDER, HUDSON et FOX, 1950 ) (116), (ALEXANDER, GOUGH et HUDSON, 1951) (117), (ALEXANDER et GOUGH , 1951) (118), (ALEXANDER, FOX et HUDSON, 1951) (119).

L'ensemble de leur expérimentation peut se résumer ainsi : une solution d'acide peracétique à 1,6 % oxyde, en 24 heures, à la température ordinaire, toute la cystine de la laine; après hydrolyse acide de la fibre oxydée, on retrouve dans l'hydrolysate toute la cystine sous forme d'acide cystéique (+). EARLAND et KNIGHT (1955) (120) ont montré que la laine, oxydée par l'acide peracétique, ne donne pas de sel d'ammonium dans les conditions où normalement l'acide cystéique donne un tel sel; ces auteurs pensent, en conséquence, que la laine oxydée contient des liaisons salines très fortes du type  $(SO_3^- \dots NH_3^+)$ , formées par action des groupements sulfoniques sur les groupements aminés libres. WESTON (1955) (122) arrive aux mêmes conclusions par l'étude du spectre infra-rouge de la laine oxydée.

Par ailleurs, ALEXANDER a montré que la cystine de la laine pouvait être divisée en deux fractions, de réactivité différente vis-à-vis des agents d'oxydation.

En effet, si l'acide peracétique oxyde toute la cystine de la laine, il y en a 75 % qui sont oxydés en 2 heures, tandis que les derniers 25 % ne sont oxydés que très lentement (24 heures); de même, le chlore libre, l'acide hypochloreux, peuvent oxyder toute la cystine si l'on emploie suffisamment de réactif, tandis que l'anion hypochloreux ( $ClO^-$  à pH 10) et les solutions acides de permanganate n'oxydent au maximum 25 %.

Les deux fractions de réactivité différente, qu'ALEXANDER met en évidence à l'aide des agents d'oxydation, ne semblent cependant pas avoir de relation avec les sous-fractions de PHILLIPS (voir plus haut) : ainsi, si l'on transforme la cystine de la fraction (A+B) de PHILLIPS en lanthionine, par action d'un alcali, la cystine restante réagit de la même façon, avec le chlore et l'hypochlorite, que la cystine d'une laine intacte. Il n'y a pas d'explication satisfaisante de ce phénomène. ALEXANDER suppose que cette réactivité

---

(+) SCHIRLE et MEYBECK (1951) (121) ont montré que le chlorite de sodium oxydait la cystine de la laine en acide cystéique.

différente vis-à-vis des agents d'oxydation pourrait être due à l'hétérogénéité chimique de la fibre de laine: la fraction la plus réactive de la cystine serait celle du ciment intercellulaire formé d'une " protéine " de faible poids moléculaire et la fraction la moins réactive appartiendrait à des " protéines " de haut poids moléculaire.

#### 4) Conclusion.

Le problème de la répartition de la cystine dans la laine pose donc un problème qui est loin d'être résolu. Il est certain que les liaisons disulfures de cet amino-acide jouent un rôle primordial dans la structure macromoléculaire de la protéine, et qu'elles conditionnent, pour une très large part, les propriétés physico-mécaniques de la fibre. Il est évident que toutes les liaisons disulfures n'ont pas la même réactivité, mais les raisons de ce phénomène sont, à l'heure actuelle, purement spéculatives. Seuls, l'isolement et la détermination de la structure de peptides à cystine d'une longueur de chaîne suffisamment grande, pourra permettre de se faire une idée sur les raisons de la réactivité variable de la cystine de la laine.

F- La réactivité des groupements polaires.

1) Réactivité des groupements carboxyliques.

Les groupements carboxyliques libres appartiennent soit aux chaînes latérales de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, soit aux amino-acides C-terminaux des chaînes polypeptidiques; mais une partie de ces groupements carboxyliques se trouve sous forme de groupements amides.

BLACKBURN, CARTER et PHILLIPS (1941) (123) ont étudié la méthylation de la laine par le sulfate de méthyle et le bromure de méthyle. Des traitements répétés au sulfate de méthyle permettent d'introduire dans la laine un nombre de groupements méthyles supérieur au nombre de groupements carboxyliques libres; aussi les auteurs émettent-ils l'hypothèse qu'il y a également méthylation de certaines liaisons peptidiques énolisées. BLACKBURN et LINDLEY (1948) (124) ont méthylié la laine suivant la technique de FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT (1945) (125) : ils arrivent à estérifier 60 % des groupements carboxyliques libres, en traitant la laine par du méthanol anhydre contenant des traces d'un acide minéral. Cette réaction a été étudiée avec plus de détails par ALEXANDER, CARTER, EARLAND et FORD (1951) (126) : la réaction est complète en 6 heures à 65°C, et il n'y a aucune hydrolyse des liaisons peptidiques ou amides au cours de l'estérification; le nombre de groupements carboxyliques estérifiables diminue avec l'augmentation du poids moléculaire de l'alcool utilisé. Ces auteurs ont utilisé également les époxydes pour estérifier la laine, suivant la technique de FRAENKEL-CONRAT (1944) (127); seule l'épichlorhydrine est capable d'estérifier, dans ces conditions, 50 % des groupements carboxyliques de la laine; mais les hydroxyles tyrosiniques et les groupements aminés réagissent également avec l'épichlorhydrine, les autres époxydes essayés sont pratiquement inactifs.

Les laines estérifiées ont une affinité très nettement augmentée pour les colorants acides en milieu neutre et une affinité très diminuée pour les colorants basiques; ces faits sont en accord avec les idées généralement admises sur le mécanisme de l'absorption des colorants acides par la laine (ALEXANDER et Coll. , 1951 ) (128).

## 2) Réactivité des groupements aminés.

Les groupements basiques de la laine appartiennent aux amino-acides N-terminaux des chaînes polypeptidiques, et aux chaînes latérales de la lysine, de l'arginine et de l'histidine. Ces groupements sont généralement assez réactifs, et par action de divers réactifs chimiques on peut modifier chimiquement la laine.

### a) Alkylation et Arylation.

On peut rappeler ici la dinitrophénylation de la laine étudiée par BLACKBURN (1950) (129) et MIDDLEBROOK (1951) (130). ZAHN et WÜRZ (1955) (131) ont montré que des laines dinitrophénylées sont beaucoup plus résistantes que des laines non traitées à l'attaque par des microorganismes.

SILVA, STEVENS et WHEWELL (1955) (132) ont étudié l'action de l'acide bromacétique sur la laine, et ont conclu que les bromacétates réagissent avec les groupes amines de la laine; on introduit ainsi des groupements carboxyliques supplémentaires dans la fibre : les laines traitées de cette façon ont beaucoup moins d'affinité que les laines normales pour les colorants acides.

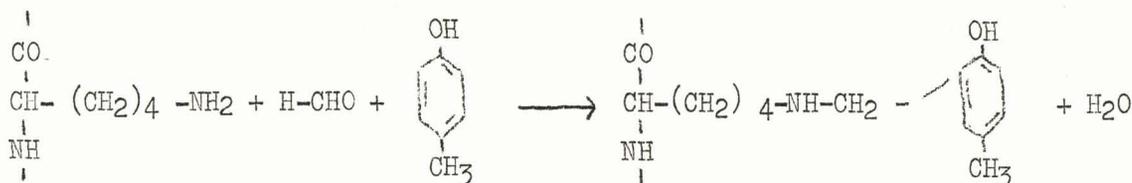
Mc PHEE et LIPSON (1954) (133) ont traité la laine par des solutions tamponnées d'aldéhydes  $\alpha$  -éthyléniques, tel que l'acroléine, l'aldéhyde crotonique, etc., ils pensent que la réaction peut se schématiser ainsi (réaction 14).



#### REACTION -14

Enfin, d'après JOHNSON (1953) (134), il se produirait une réaction de MANNICH (135) avec les groupements  $\epsilon$  -NH<sub>2</sub> de la lysine, lorsqu'on traite la laine par une solution de formol et de phénols. (réaction 15).

( voir page suivante )



REACTION -15

b) Acylation.

L'acylation de la laine, qui transforme les groupements aminés en groupements amidés non ionisables, a fait l'objet de plusieurs études, car elle permet de préparer des laines qui ne se teignent plus par les colorants acides. Les Etablissements KUHLMANN en France ( Brevet Français n° 550.033, 11 Avril 1922) et l'I.G. FARBEN ( British Intelligence Objective Sub. Committee report n° 1472, H.M Stationary Office, 1947 ) ont mis sur le marché des laines acétylées. Leur procédé consiste essentiellement à traiter la laine anhydre, à la température de 55°C, par un mélange d'anhydride acétique, d'acide acétique, d'acide sulfurique et d'une amine tertiaire (pyridine ou diméthylaniline).

ALEXANDER, HUDSON et FOX (1950) (136) ont montré que, dans ces conditions, on pouvait acétyler plus de 90 % des groupements aminés de la laine sans provoquer une altération des ponts disulfures. LINDLEY et PHILLIPS (1947) (137) ont trouvé que l'anhydride acétique seul, à l'ébullition, acétyle tous les groupements aminés terminaux et ceux de la lysine et de l'arginine, mais la fibre est assez nettement altérée par ce traitement.

RATH, MEYER et BIERLING (1952) (138) réduisent l'affinité de la fibre pour les colorants acides en la traitant par le sous-oxyde de carbone (C<sub>3</sub>O<sub>2</sub>); ils pensent qu'il se produit une malonylation des groupements basiques ( -NH-CO-CH<sub>2</sub>-COOH ), mais que si l'on prolonge le traitement, il y a création de ponts du type -NH-CO-CH<sub>2</sub>-CO-NH-.

FARNWORTH (1955) (139) a montré que la laine traitée par l'isocyanate de phényle, suivant la technique de FRAENKEL-CONRAT (1945) (140), était remarquablement inerte du point de vue chimique. ( voir plus haut : réactivité des liaisons disulfures ).

c) Désamination.

SPEAKMAN (1936) (141), RUTHERFORD, HARRIS et SMITH (1937) (142) ont trouvé qu'un grand nombre de groupements aminés dans la laine pouvaient être éliminés par la réaction avec l'acide nitreux, si l'on prolongeait le traitement pendant 6 jours; mais, dans ces conditions, il y a oxydation des liaisons disulfures. COCKBURN, DRUCKER et LINDLEY (1948) (143) ont montré qu'il y avait, en outre, destruction de la tyrosine au cours de ce traitement.

3) Réactivité des hydroxyamino-acides.

Les groupements hydroxyles de la laine appartiennent à la sérine, à la thréonine, à l'hydroxylysine, et à la tyrosine (OH phénolique).

La réactivité des hydroxyles alcooliques a été peu étudiée : REITZ, FERREL, FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT (1946) (144) ont montré que l'acide sulfurique à 0°C pouvait sulfoner la sérine d'un certain nombre de protéines, y compris la laine.

Au contraire, la tyrosine est très réactive, et elle conditionne, pour une bonne part, les propriétés chimiques de la fibre.

La tyrosine de la laine peut être méthylée par le diazométhane ( RUTHERFORD, PATTERSON et HARRIS 1940) (145). ZAHN et KOHLER (1950) (146) arrivent à nitrer toute la tyrosine par action de l'acide nitrique à 70°C.

ALEXANDER et GOUGH (1951) (147) ont montré que cet amino-acide pouvait, comme la cystine, être divisé en deux fractions de réactivité différente vis-à-vis des agents d'oxydation : l'hypochlorite de sodium et le permanganate de potassium, en milieu acide, n'oxydent que 30 % de la tyrosine de la fibre, tandis que des agents d'oxydation plus puissants, le chlore et le permanganate alcalin, oxydent la totalité. Ces auteurs pensent que la fraction la plus réactive appartient à des polypeptides de faible poids moléculaire.

En traitant la laine par une solution alcoolique d'iode (72 heures à 22°C), on transforme 96 % de la tyrosine en 3,5-diiodotyrosine (RICHARDS et SPEAKMAN 1953) (148).

4) Formation de nouvelles liaisons transversales.

Les ponts disulfures entre les chaînes polypeptidiques sont responsables, en grande partie, de l'insolubilité de la laine dans les solvants polaires, de son gonflement limité dans l'eau, et de sa résistance mécanique relativement élevée à l'état humide. L'introduction, dans la molécule, de nouvelles liaisons transversales, pour augmenter les qualités textiles de la fibre, présente donc un intérêt pratique considérable. En vue de réaliser ceci, un grand nombre de réactifs ont été essayés. En général les auteurs n'ont pas déterminé la nature et le nombre de groupements polaires de la protéine qui réagissent, mais se sont contentés d'étudier les variations d'un certain nombre de propriétés des fibres : résistance à la traction, élasticité, solubilité dans la soude (test de HARRIS voir 2ème partie, chapitre 11), supercontraction (+), résistance aux microorganismes, augmentation de poids des fibres.

L'action du formol sur les protéines a fait l'objet de nombreuses recherches. La nature des groupements polaires qui peuvent réagir a été étudiée avec beaucoup de détails par FRAENKEL-CONRAT et ses collaborateurs (1945) (149); ceux-ci ont montré que le formol peut réagir avec les groupements amine, amide, guanidyle, indol et phénol, et réduire les liaisons disulfures.

Les liaisons transversales peuvent s'établir entre les groupements amines et amides d'après la réaction suivante ( réaction 16).



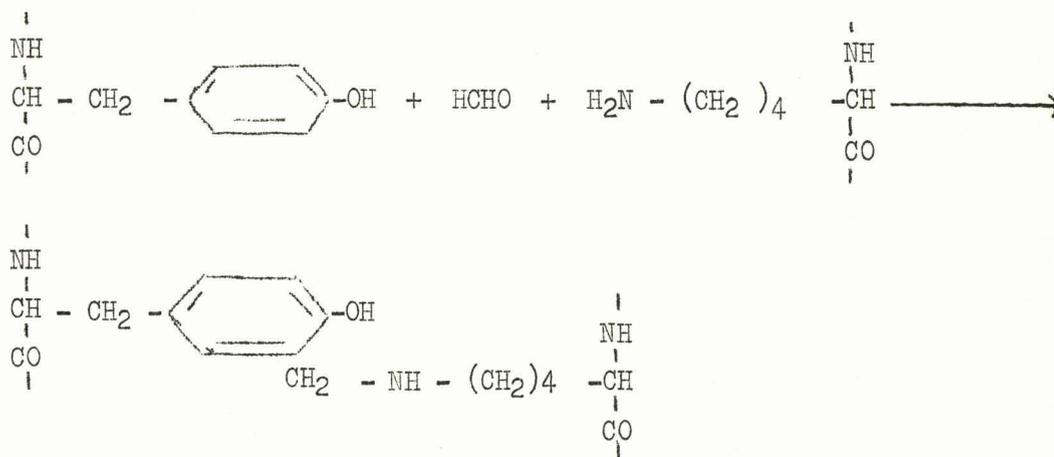
REACTION -16

---

(+) Certains réactifs, tels que le bisulfite de sodium concentré à 100°C, provoquent la contraction de la fibre en longueur; ce phénomène, appelé supercontraction, ne se produit pas si l'on a introduit dans la molécule de nouvelles liaisons transversales.

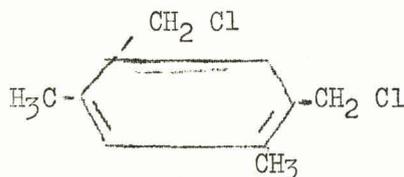
MIDDLEBROOK (1949) (150) a montré qu'en milieu acide (pH 1 à 2) et à 100°C, la laine se combine avec le formol; par ébullition de la laine formolée dans une solution d'acide phosphorique 0,1 M, on détruit la combinaison formée; seule, une petite quantité de formol (1,17 %) reste irréversiblement combinée avec la protéine. MIDDLEBROOK émet l'hypothèse que le formol forme des liaisons transversales entre les groupements amides de la glutamine et les groupements guanidyles de l'arginine.

Plus récemment, ALEXANDER et Coll. (1951) (151) ont montré qu'une petite quantité de formol se combine irréversiblement avec la laine à 60°C en milieu neutre. La teneur en tyrosine de la laine formolée diminue; aussi, ALEXANDER pense que le formol crée des liaisons transversales, par une réaction de MANNICH (152), entre la lysine et la tyrosine, d'après la réaction 17.

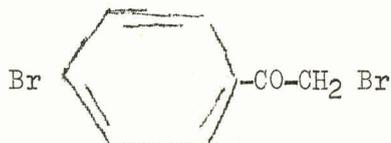


REACTION - 17

De nombreux agents d'alkylation bifonctionnels ont été essayés sur la laine. On peut citer entre autres les travaux de KIRST (1947) (153), qui utilise notamment : les éthers chlorométhyliques (Cl - CH<sub>2</sub> - O - CH<sub>2</sub> - Cl), le 1,3-bis-chlorométhyl)-4,6-dyméthylbenzène



et la p. bromo-*w*-bromacétophénone.





G - La structure stéréochimique de la Kératine (+).

Ce qui précède montre que la détermination de la structure chimique de la laine est un problème extrêmement complexe. Pour être résolu, il demande que l'on trouve des méthodes qui permettent d'extraire de la fibre, sans les altérer, des protéines pures, et que l'on détermine ensuite la séquence des amino-acides dans les différentes chaînes polypeptidiques.

Cette structure chimique une fois établie, il reste à déterminer l'arrangement spatial des atomes, c'est-à-dire les distances interatomiques et les angles des liaisons de valence. Ce problème de la structure stéréochimique des protéines peut néanmoins être abordé partiellement, sans qu'il soit nécessaire de connaître la séquence des amino-acides dans les chaînes, grâce à l'étude des clichés de diffraction qu'elles donnent aux rayons X.

Depuis 1931, ASTBURY et ses collaborateurs (156 à 163) se sont attachés à établir la structure stéréochimique des protéines fibreuses et celle de la laine en particulier. Ils ont montré notamment que la fibre de laine pouvait donner aux rayons X deux diagrammes de diffraction différents. Le premier, qui correspond à l' $\alpha$ -kératine, est fourni par une laine qui n'a subi aucun étirement; le second correspond à la  $\beta$ -kératine, on l'obtient lorsqu'on allonge la fibre de plus de 50 % de sa longueur primitive : ces deux formes sont considérées comme des " stéréoisomères mécaniques ".

On peut passer de la forme  $\alpha$  à la forme  $\beta$  et inversement, en allongeant lentement la fibre dans l'eau puis en relâchant la tension ainsi appliquée. Jusqu'à 20 % d'extension, le cliché de diffraction donné par la fibre reste inchangé ( $\alpha$ -kératine) ; si l'allongement dépasse 20 % (++) la photographie originale commence à se modifier et les changements deviennent nettement apparents lorsque l'allongement est de l'ordre de 35 %, ils atteignent leur maximum pour un allongement de 70 %, on obtient alors un diagramme typique de  $\beta$ -kératine. En opérant dans la vapeur ou dans les solutions alcalines on peut obtenir un allongement de 100 % ( la fibre a doublé de longueur).

---

(+) L'exposé détaillé de cette question sort du cadre de ce travail; nous nous sommes contentés de la résumer brièvement.

Pour de plus amples renseignements nous renvoyons à l'ouvrage suivant :  
The Proteins, Volume 1, Partie A, Chapitre 4. (H. NEURATH et K. BAILEY  
éditeurs) -Academic Press Inc. New-York.

(++) Pour obtenir des allongements dépassant 20 %, il faut opérer dans l'eau, sinon on observe une rupture de la fibre.

1) La structure de la  $\beta$  -kératine.

Le diagramme de diffraction des rayons X de la  $\beta$  -kératine montre qu'il y a un motif d'une longueur de  $3,3 \text{ \AA}$ , qui se répète tout le long de l'axe de la fibre, et deux réflexions très nettes perpendiculaires à l'axe : l'une égale à  $9,8 \text{ \AA}$  - comme dans l' $\alpha$  -kératine - et une autre égale à  $4,65 \text{ \AA}$  et faisant un angle droit avec la première.

Ce diagramme est typiquement un diagramme de fibre et il ressemble de très près à celui que donne la soie.

Le motif d'une longueur de  $3,3 \text{ \AA}$  est celui de " l'épine dorsale " des chaînes peptidiques ( voir figure 5) cette distance correspond à celle d'une chaîne peptidique en état de presque complète extension. La distance réticulaire de  $4,65 \text{ \AA}$  correspond à la distance qui sépare les " épines dorsales " des deux chaînes polypeptidiques, ces chaînes sont liées entre elles par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre les groupements NH et CO voisins.

Les différentes chaînes polypeptidiques ainsi rassemblées forment des " grilles ", les chaînes latérales des amino-acides sont situées perpendiculairement à ces " grilles ". La  $\beta$  -kératine serait ainsi formée par un ensemble de "grilles" parallèles, distantes les unes des autres de  $9,8 \text{ \AA}$ . (Dans la soie, l'espacement des "grilles" n'est que de  $4,5$  à  $6,1 \text{ \AA}$ , car les chaînes latérales sont moins encombrantes que dans la kératine).

2) La structure de l' $\alpha$  -kératine.

L'interprétation du diagramme de diffraction des rayons X donné par l' $\alpha$ -kératine, - c'est-à-dire par la fibre non étirée -, est beaucoup plus difficile.

La longueur du motif structural s'accorde avec un repliement des chaînes polypeptidiques, et le passage de la forme  $\alpha$  à la forme  $\beta$  s'explique par le " déplissage " des chaînes.

La forme exacte de ce "pli" n'est cependant pas encore élucidée.

Pour ASTBURY et BELL (164) la structure de l' $\alpha$ -kératine doit répondre aux cinq conditions suivantes :

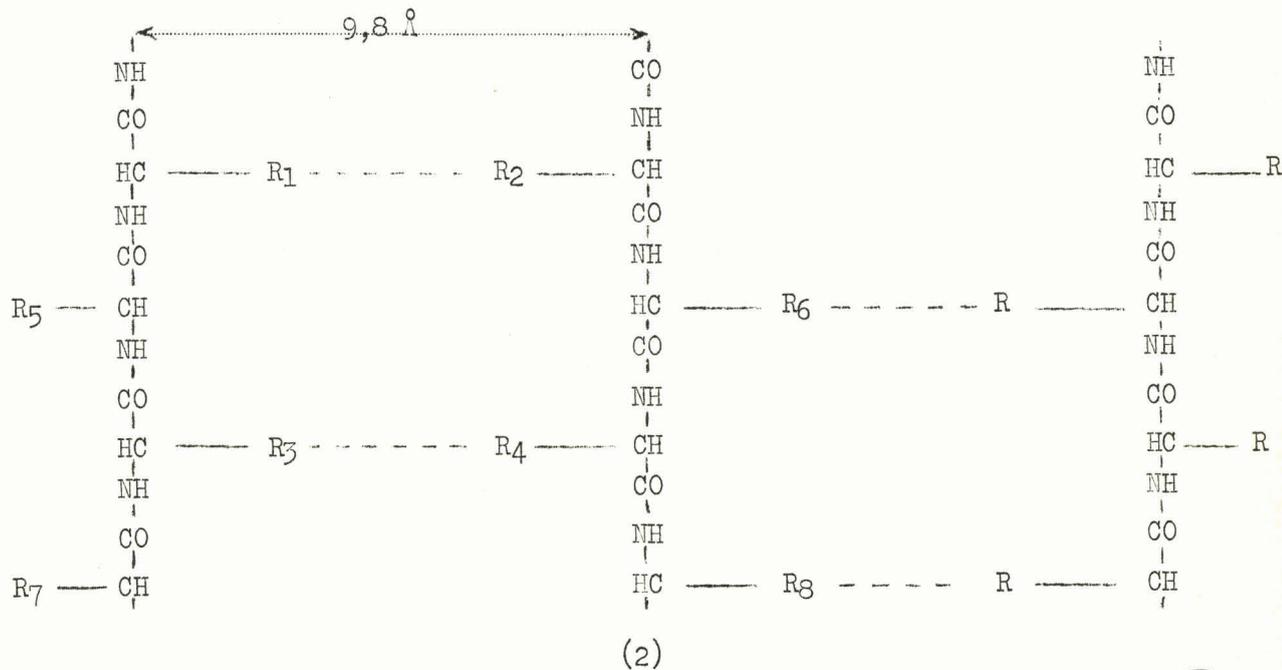
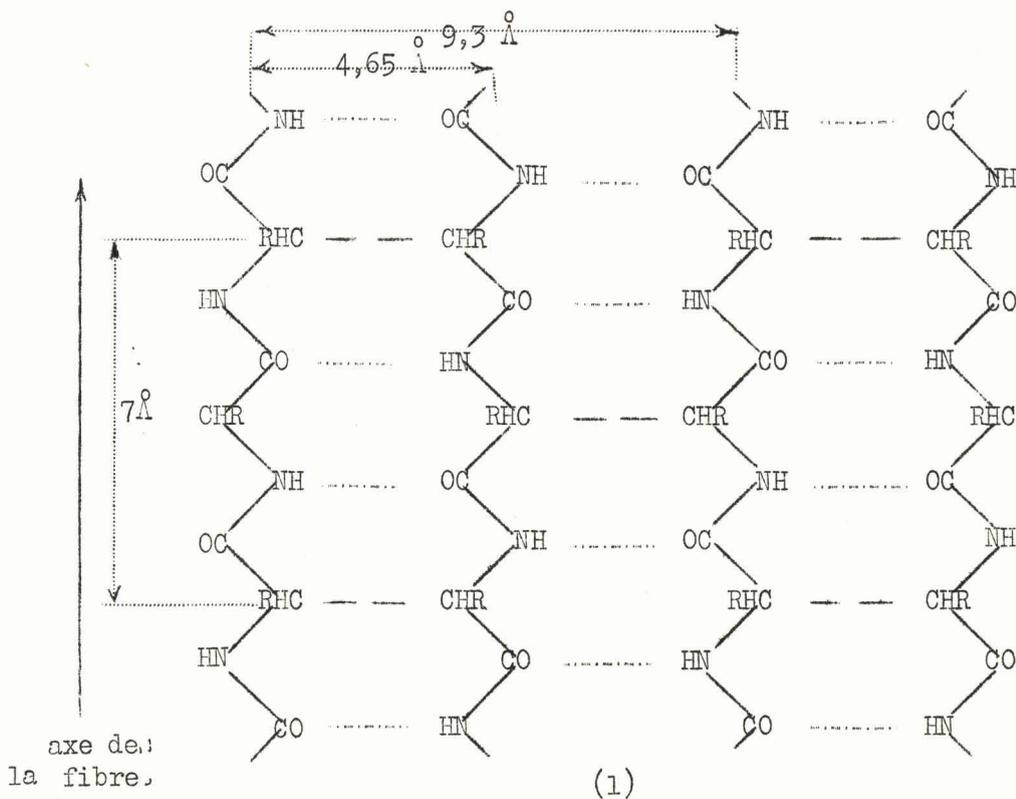


FIGURE - 5

Représentation schématique de la structure de la  $\beta$ -kératine.

(1)-Schéma d'une "grille" formée par un assemblage compact de chaînes polypeptidiques et montrant les intervalles qui séparent les "épinés dorsales" de ces chaînes.- (2)-Vue en coupe de trois "grilles" parallèles, montrant l'espacement (9,8 Å) produit par l'encombrement dû aux chaînes latérales. Les grilles peuvent être réunies entre elles par des liaisons disulfures. (D'après W.T Astbury et H.J. Woods, Phil. Trans. Roy. Soc. (London) A 232,333 (1933) ).



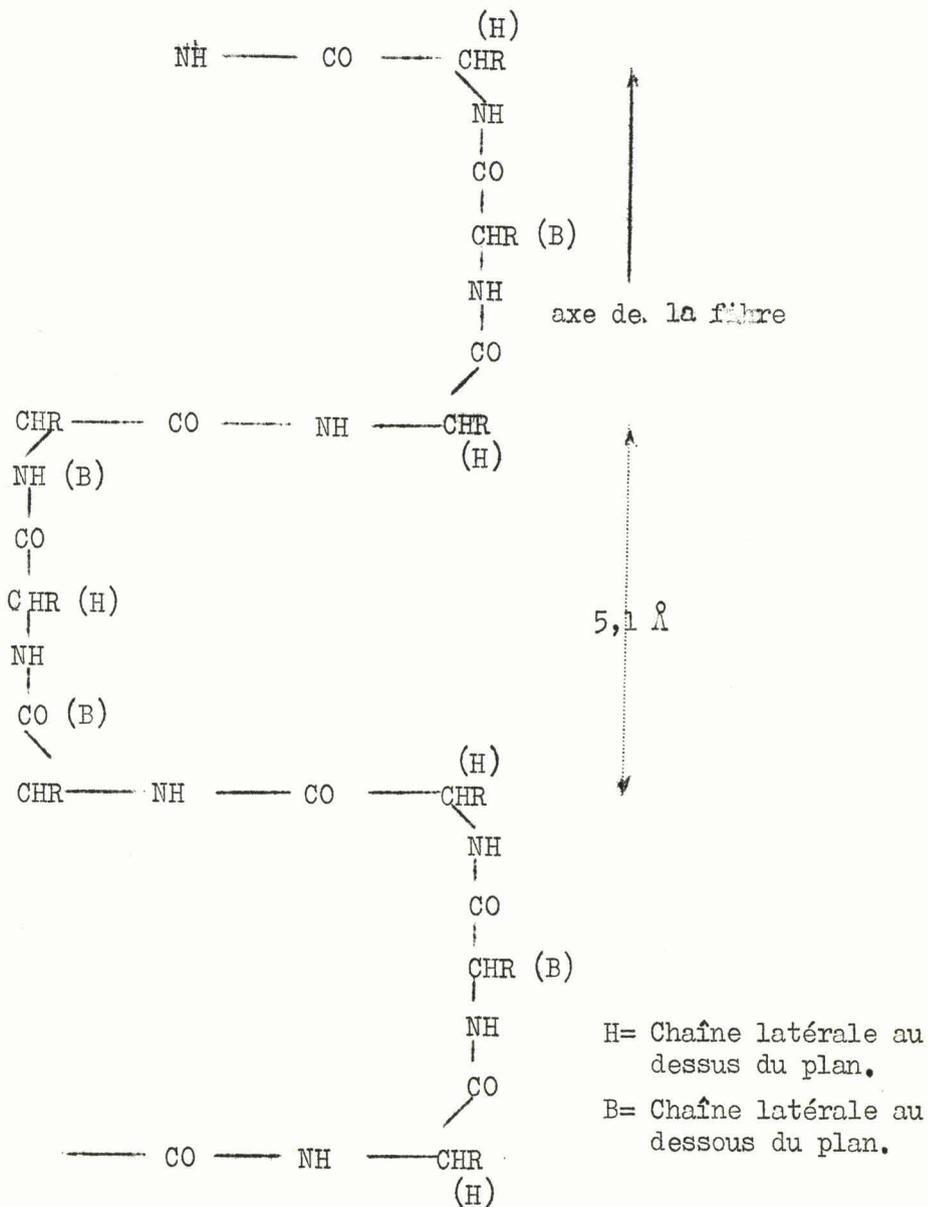


FIGURE - 6

Représentation schématique de la  $\beta$ -kératine d'après Astbury.



1°) Les plis doivent se répéter à une distance d'environ  $5,1 \text{ \AA}$ .

2°) L' "épine dorsale " d'une chaîne peptidique dans l'  $\alpha$  -kératine doit avoir une longueur égale à environ la moitié de celle qu'elle a dans la  $\beta$  -kératine ( cette condition permettrait d'expliquer l'allongement de 100 % que l'on peut faire subir à la fibre).

3°) Comme le montrent les résultats expérimentaux, la densité doit rester la même après allongement (soit 1,3).

4°) Chaque pli doit contenir trois résidus d'amino-acides. En effet, dans une chaîne polypeptidique en état de complète extension, chaque résidu a une longueur de  $3,5 \text{ \AA}$ , il s'ensuit que cette longueur doit être de  $1,7 \text{ \AA}$  environ dans une chaîne contractée à la moitié de sa longueur primitive; par conséquent le nombre de résidus par pli est de  $\frac{5,1}{1,7} = 3$ .

5°) Les chaînes latérales des amino-acides doivent se placer alternativement de chaque côté du plan formé par ce pli.

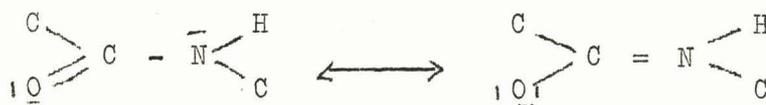
Sur ces bases, ASTBURY et BELL ont construit un modèle de l' $\alpha$  -kératine qui respecte les distances interatomiques connues pour les composés organiques ( voir figure 6).

La représentation, donnée par ASTBURY pour l' $\alpha$  -kératine, a été très controversée, et d'autres formes de "pli" ont été proposées.

### 3) La structure en hélice de PAULING-COREY.

PAULING et COREY (165) ont déterminé avec une très grande précision les distances interatomiques et les angles des liaisons de valence dans la chaîne peptidique, ils en ont conclu que le modèle donné par ASTBURY pour l' $\alpha$  -kératine est incompatible avec leurs résultats.

Un caractère particulièrement important de la structure de la chaîne peptidique est la planéité du groupe amide; en effet le groupe amide est hybride de résonance entre les deux structures électroniques, et la résonance ne peut s'établir que dans le plan :



PAULING admet par ailleurs que dans l' $\alpha$ -kératine et dans les polypeptides synthétiques, chaque groupe amide forme avec ses voisins le maximum de liaisons hydrogène possibles, et que ces groupes amides ont la configuration " trans ".

A partir de ces données, PAULING montre, à l'aide de modèles moléculaires, que la seule configuration stéréochimique possible pour une chaîne polypeptidique sous forme de pli alpha est une hélice alpha.

L'hélice alpha a environ 3,60 résidus d'acides-amino par spire, soit 18 résidus en 5 tours. PAULING avait calculé que la pas de l'hélice devrait être de  $5,4 \text{ \AA}$ , ce qui représente une valeur de  $\frac{5,4}{3,6} = 1,5 \text{ \AA}$  par résidu d'acide-amino dans la direction de l'axe de l'hélice (+).

PERUTZ (166), en 1951, confirma ces vues de PAULING, en montrant que les polypeptides synthétiques donnent aux rayons X une réflexion correspondant à un motif d'une longueur de  $1,5 \text{ \AA}$ ; cette réflexion est maintenant reconnue comme caractéristique d'un certain nombre de protéines du type  $\alpha$ -kératine.

La structure en hélice n'est cependant pas pleinement satisfaisante dans le cas de l' $\alpha$ -kératine, notamment elle n'explique pas la réflexion très caractéristique à  $5,1 \text{ \AA}$  donnée par les protéines de ce type, de plus la densité de la kératine est nettement plus élevée (1,3) que celle prévue par la forme en hélice (1,15).

Pour surmonter ces difficultés PAULING et COREY ont perfectionné leur théorie: ils supposent que la kératine alpha serait formée de cables à sept brins (chaînes polypeptidiques), composés de six hélices alpha enroulées autour d'une hélice alpha centrale. Ces cables à sept brins seraient groupés en faisceaux hexagonaux et les interstices laissés entre eux seraient remplis d'hélices alpha additionnelles.

Le problème de la structure stéréochimique de la kératine alpha est donc loin d'être résolu.

Ces études ont cependant eu jusqu'à présent un immense intérêt: celui de montrer la parenté de configuration stéréochimique entre les polypeptides synthétiques, la kératine de la laine, des cheveux, de la corne, les protéines du muscle (myosine), le fibrinogène du sang, et les flagelles bactériens.

---

(+) On peut se représenter la chaîne polypeptidique en hélice sous forme d'un escalier en spirale dont les marches figureraient les restes d'acides-amino; la valeur de  $1,5 \text{ \AA}$  correspond alors à la hauteur de la marche de l'escalier.

BIBLIOGRAPHIE

- 3.- ABDERHALDEN (E.) et VOITINOVICI (A.), Hoppe-Seyler's Z., 1907, 52, 348.
- 34.- AKABORI (S.), OHNO (K.) et MARITA (K.), Bull. Chem. Soc. Japan, 1952, 25, 214.
- 38 -78-79.- ALEXANDER (P.) et HUDSON (R.F.), Wool: üst Chemistry and Physics (Chapman et Hall éd.)1954,p.343,356.
- 75-116-136.- ALEXANDER (P.), HUDSON (R.F.) et FOX (M.), Biochem.J., 1950, 46, 27.
- 77.- ALEXANDER (P.) et EARLAND (C.), Nature, 1950, 166, 396.
- 117.- ALEXANDER (P.), GOUGH (D.) et HUDSON (R.F.), Biochem. J., 1951, 48, 20.
- 118-147.- ALEXANDER (P.) et GOUGH (D.), Biochem. J., 1951, 48, 504.
- 126-128.- ALEXANDER (P.), CARTER (D.), EARLAND (C.) et FORD (O.E.), Biochem.J.,1951, 48, 629.
- 151.- ALEXANDER (P.), CARTER (D.) et JOHNSON (K.G.), Biochem.J., 1951, 48, 435.
- 119.- ALEXANDER (P.), FOX (M.) et HUDSON (R.F.), Biochem. J., 1951, 49, 129.
- 155.- ALEXANDER (P.), FOX (M.), STACEY (K.A.) et SMITH (L.F.), Biochem.J., 1952, 52, 177.
- 156.- ASTBURY (W.T.) et STREET (A.), Phil. Trans. Roy. Soc., 1931, 230 A, 75.
- 157.- ASTBURY (W.T.) et WOODS (H.J.), Phil. Trans. Roy. Soc., 1933, 232 A, 333.
- 158.- ASTBURY (W.T.) et SISSON (W.A.), Proc. Roy. Soc., 1935, 150 A, 533.
- 159-164.- ASTBURY (W.T.) et BELL (F.O.), Nature, 1941, 147, 696.
- 160.- ASTBURY (W.T.), J. Chem. Soc. 1942, 337.
- 37-161.- ASTBURY (W.T.), Advances in Enzymology, 1943, 3, 63.
- 162.- ASTBURY (W.T.), Proc. Roy. Soc., 1947, 134 B, 303.
- 163.- ASTBURY (W.T.), Annales scientifiques textiles belges 1955, n°3, p.22.
- 21.- BAILEY (K.), Biochem.J., 1937, 31, 1396.
- 20.- BARRITT (J.), Biochem. J., 1934, 28, 1.

- 106.- BERGMANN (M.) et STATHER (F.), Hoppe-Seyler Z., 1926, 152, 189.
- 29- 40-129.- BLACKBURN (S.), Biochem. J. 1950, 47, 443.
- 33.- BLACKBURN (S.) et LEE (G.R.), Wool Industries Research Ass. 1954. Publication n°199, Report of the Director of Research for 1953-54, Leeds, England.
- 123.- BLACKBURN (S.), CARTER (E.G.H.) et PHILLIPS (H.), Biochem. J. 1941, 35, 627.
- 124.- BLACKBURN (S.) et LINDLEY (H.), J. Soc. Dyers Colourists. 1948, 64, 505.
- 107.- BLACKBURN (S.) et LEE (G.R.), Biochem. Biophys. Acta, 1956, 19, 505.
- 100.- CARTER (E.G.H.), MIDDLEBROOK (W.R.) et PHILLIPS (H.), J. Soc. Dyers Colourist., 1946, 62, 203.
- 143.- COCKBURN (R.), DRUCKER (B.) et LINDLEY (H.), Biochem.J., 1948, 43, 438.
- 35.- CONSDEN (R.), GORDON (A.H.) et MARTIN (A.J.P.), Biochem. J., 1949, 44, 548.
- 39.- CONSDEN (R.) et GORDON (A.H.); Biochem.J., 1950, 46, 8.
- 114.- CONSDEN (R.), GORDON (A.H.) et MARTIN (A.J.P.), Biochem.J., 1946, 40, 580.
- 10- 15.- CORFIELD (M.B.) et ROBSON (A.), Biochem.J., 1955, 59, 62.
- 23- 97-103-108.- CUTHBERTSON (W.R.) et PHILLIPS (H.), Biochem.J., 1945, 39, 7.
- 70.- DAS (D.B.) et SPEAKMAN (J.B.), J. Soc. Dyers Colourists 1950, 66, 583.
- 120.- EARLAND (C.) et KNIGHT (C.S.), Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 457.
- 93.- ELSWORTH (F.F.) et PHILLIPS (H.), Biochem. J., 1938, 32, 837.
- 94.- ELSWORTH (F.F.) et PHILLIPS (H.), Biochem. J., 1941, 35, 135.
- 102-115.- FARNWORTH (A.J.), Biochem.J., 1955, 60, 626.
- 139.- FARNWORTH (A.J.), Biochem.J., 1955, 59, 529.
- 4.- FISCHER (E.), Ber. dtsh. chem.Ges., 1901, 34, 433.
- 76.- FOX (M.), Ph. D. thèse 1951 (London Univ.)
- 125.- FRAENKEL-CONRAT (H.) et OLCOTT (H.S.), J. Biol. Chem. 1945, 161, 259.
- 127.- FRAENKEL-CONRAT (H.), J. Biol. Chem. 1944, 154, 227.
- 140.- FRAENKEL-CONRAT (H.), J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 314.
- 149.- FRAENKEL-CONRAT (H.), COOPER (M.) et OLCOTT (H.S.), J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 950.

- 85.- FRASER (R.D.B.) et ROGERS (G.E.), Biochim. Biophys. Acta, 1953, 12, 484.
- 87.- FRASER (R.D.B.) et ROGERS (G.E.), Australian J. Biol. Sci., 1955, 8, 288.
- 55- 61- 67.- FRIEND (J.A.) et O'DONNELL (S.J.), Australian J. Biol. Sci., 1953, 6, 630.
- 113.- GEIGER (W.B.), HOBAYASKI (F.F.) et HARRIS (M.), J. Res. N.B.S., 1942, 29, 381.
- 59- 86.- GILLESPIE (J.M.) et LENNOX (F.G.), Biochim. Biophys. Acta, 1953, 12, 48.
- 59- 69.- GILLESPIE (J.M.) et LENNOX (F.G.), Australian J. Biol. Sci., 1955, 8, 97.
- 58-111.- GODDARD (D.R.) et MICHAELIS (L.), J. Biol. Chem., 1934, 106, 605.
- 6- 18- 44- 91.- GOLDEN (R.L.), WHITWELL (J.C.) et MERCER (E.H.), Textile Research J., 1955, 25, 334.
- 11- 16.- GRAHAM (C.E.), WAITKOFF (H.K.) et HIER (S.W.), J. Biol. Chem. 1949, 177, 529.
- 48.- HAPPEY (F.) et WORMELL (R.L.), J. Textile Inst., 1949, 40, 855.
- 60.- HARRAP (B.S.), Australian J. Biol. Sci., 1955, 8, 122.
- 80.- HORIO (M.) et KONDO (T.), Textile Research J., 1953, 23, 373.
- 105.- HORN (M.J.), JONES (D.B.) et RINGEL (S.J.), J. Biol. Chem. 1941; 138, 141.
- 134.- JOHNSON (K.G.), Textile Research J., 1953, 23, 443.
- 45- 63.- JONES (C.B.) et MECHAM (D.K.), Arch. Biochem., 1943, 2, 209.
- 49- 64.- JONES (C.B.) et MECHAM (D.K.), Arch. Biochem, 1943, 3, 193.
- 19.- KASSEL (B.) et BRAND (E.), J. Biol. chem., 1938, 125, 115.
- 153.- KIRST (W.), Melliand Textilber., 1947, 28, 169; 314, 394; 1948, 29, 276.
- 90.- LINDLEY (H.), Nature, 1947, 160, 190.
- 98-104.- LINDLEY (H.) et PHILLIPS (H.), Biochem. J., 1945, 39, 17.
- 99-137.- LINDLEY (H.) et PHILLIPS (H.), Biochem. J., 1947, 41, 34.
- 135-152.- MANNICH (réaction de), Organic Reactions, Vol. 1 p.303 (R. Adams éditeur).
- 24.- MARSTON (H.R.), "Fibrous Proteins ". Symposium of the Society of Dyers and Colourists. Bradford. 1946, p.207.
- 36.- MARTIN (A.J.P.), " Fibrous Proteins ", Symposium of the Society of Dyers and Colourists. Bradford. 1946, p.3.
- 133.- Mc PHEE (J.R.) et LIBSON (M.), Australian J. Chem., 1954, 7, 387.

- 51- 65.- MERCER (E.H.) et OLOFSSON (B.), J. Polymer Sci., 1951, 6, 671.
- 81- 88.- MERCER (E.H.), Textile Research.J., 1953, 23, 388.
- 82- 84.- MERCER (E.H.), GOLDEN (R.L.) et JEFFRIES (E.B.), Textile Research. J., 1954, 24, 615.
- 13.- MIDDLEBROOK (W.R.), Nature, 1949, 164, 321.
- 31- 41- 50-130.- MIDDLEBROOK (W.R.), Biochem. Biophys. Acta, 1951, 7, 547.
- 95-109-112.- MIDDLEBROOK (W.R.) et PHILLIPS (H.), Biochem.J., 1942, 36, 294.
- 96-110.- MIDDLEBROOK (W.R.) et PHILLIPS (H.), Biochem.J., 1947, 41, 218.
- 150.- MIDDLEBROOK (W.R.), Biochem.J., 1949, 44, 17.
- 9.- MOORE (S.) et STEIN (W.H.); J. Biol. chem. 1951, 192, 663.
- 57.- O'DONNELL (I.J.), Textile Research.J. 1954, 24, 1058.
- 47- 62.- OLOFSSON (B.) et GRALEN (W.), Medd. Svenska Textilforsknings-sint, Göteborg, 1951, n°14, 57.
- 113.- PATTERSON (W.I.), GEIGER (W.B.), MIZELL (L.R.) et HARRIS (M.) J. Res. N.B.S., 1941, 27, 89.
- 165.- PAULING (L.) et COREY (R.B.) Proc. U.S. Nat. Acad. Sci., 1951, 37, 241.  
Nature, 1953, 171, 59.
- 166.- PERUTZ (M.F.), Nature, 1951, 167, 1053.
- 83-101.- PHILLIPS (H.), "Fibrous: Proteins ", Symposium of the Society of Dyers and Colourists. Bradford. 1946, p.39.
- 138.- RATH (H.), MEYER (H.) et BIERLING (H.), Melliand Textilber, 1952, 33, 427.
- 144.- REITZ (H.C.), FERREL (R.E.), FRAENKEL-CONRAT (H.) et OLCOTT (H.S.), J. Ann. chem. Soc., 1946, 68, 1026.
- 148.- RICHARDS (H.R.) et SPEAKMAN (J.B.); Nature, 1953, 171, 751 et J. Soc. Dyers Colourists. 1955, 71, 537.
- 142.- RUTHERFORD (H.A.), HARRIS (M.) et SMITH (A.L.), J. Res. N.B.S. 1937, 19, 467.
- 145.- RUTHERFORD (H.A.), PATTERSON (W.I.) et HARRIS (M.), J. Res. N.B.S., 1940, 25, 457.
- 30.- SANGER (F.), Biochem.J., 1945, 39, 507.
- 74.- SANGER (F.), Biochem. J., 1949, 44, 126.
- 121.- SCHIRLE (C.) et MEYBECK (J.), C.R. Acad. Sciences 1951, 232, 526, 732, 1219.
- 22.- SCHÖBERL (A.) et RAMBACHER (P.), Biochem. Z., 1940, 306, 269.
- 25- 92.- SHINOHARA (K.), J. Biol. Chem. 1935, 109, 665;  
1936, 112, 671 à 683.

- 132.- da SILVA (M.A.), STEVENS (C.B.) et WHEWELL (C.S.), Congrès International de la recherche scientifique appliquée à l'Industrie Textile- Bruxelles Juin 1955.
- 5- 8- 14- 28.- SIMMONDS (D.H.), Australian J. Biol. Sci., 1954, 7, 98.
- 27.- SPEAKMAN (J.B.) et HIND (J.R.), Trans. Faraday, Soc., 1933, 29, 148.
- 42.- SPEAKMAN (J.B.) et Mc MAHON (P.R.), Nature, 1938, 141, 118.
- 52.- SPEAKMAN (J.B.) et MENKART (J.), Bull. Inst. Textile France, 1952, n°30, 315.
- 71.- SPEAKMAN (J.B.), " Fibre Science " (J.M. Preston éditeur) chap.16.
- 72.- SPEAKMAN (J.B.), Melliand Textilber., 1952, 33, 823.
- 141.- SPEAKMAN (J.B.), J. Soc. Dyers Colourists, 1936, 52, 335.
- 43.- STAKHEYEWA-KAVERZNEWA (C.) et GAVRILOW (N.L.), Bull. Soc.Chim. Fr. 1937, 4, 647.
- 1.- TRISTRAM (G.R.), "The Proteins ", Vol.1, Part.A, Chapitre 3 (H. Neurath et K. Bailey éditeurs). Academic Press. Inc. New-York .
- 32.- TIBBS (J.), Cité par SPEAKMANN (J.B.), Melliand Textilber, 1952, 33, 823.
- 73.- TOENNIS (G.) et HOMMILLER (R.P.), J. Ann. Chem. Soc., 1942, 64, 3054.
- 53.- VANOVERBEKE (M.), MAZINGUE (G.) et DESPRETS (P.), Bull. Inst. Textile France, 1954, n°50, 27.
- 2.- VON BERGEN (W.) et MAUERSBERGER (H.R.), "American Wool Handbook" p.81. (Barnes Printing Co, Inc. New-York).
- 7-12- 17- 89.- WARD (W.H.), BINKLEY (C.H.) et SNELL (M.S.), Textile Research J. 1955, 25, 314.
- 26- 46.- WARD (W.H.) et LUNDGREN (H.P.) "Advances in Protein chemistry " Vol.9, p.243. (M.L. Anson, K. Bailey et J.T. Edsall éditeurs), Academic Press Ins. New-York.
- 56- 68.- WARD (W.H.), Textile Research J., 1952, 22, 405.
- 122.- WESTON (G.J.), Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 462.
- 54- 66.- WOODS (E.F.), Australian J. Sci. Research, 1952, 5 A, 555.
- 131-154.- ZAHN (H.) et WÜRZ (A.), Textile Research.J., 1955, 25, 115 et 118.
- 146.- ZAHN (H.) et KOHLER (K.), Z. Naturf. 1950, 56, 137.
-

DEUXIEME PARTIE

RESULTATS PERSONNELS

CHAPITRE I

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

I) Matériel.

Les expériences sont effectuées sur une laine Mérinos 100-105 non médullée, (diamètre moyen 22  $\mu$ ), lavée industriellement, mais dans des conditions assez douces pour qu'il n'y ait pratiquement pas d'altération chimique de la fibre. Pour les expériences d'hydrolyse par des agents chimiques on utilise un tissu léger; les hydrolyses enzymatiques sont réalisées sur du ruban peigné.

La laine après rinçage prolongé et séchage, est dégraissée pendant 4 heures par l'éther sulfurique dans un appareil de Soxhlet. L'humidité est déterminée sur chaque échantillon, tous les résultats de dosage se rapportent donc au poids de laine anhydre.

II) Dosage de l'Azote.

Il est effectué par microkjeldahl.

III) Dosage du Soufre, thiol et disulfure.

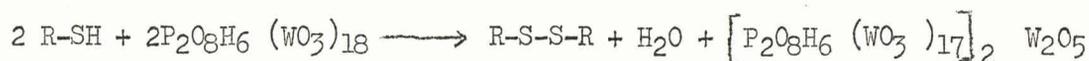
Nous avons utilisé la technique de SHINOHARA (1) légèrement modifiée, celle-ci n'étant d'ailleurs elle-même qu'une modification de la méthode de FOLIN (2).

SPEAKMAN (3) a fait une étude critique de cette technique, montrant qu'elle était excellente pour l'évaluation de la cystine dans la laine,

mais beaucoup moins intéressante pour celle de la cystéine, qui peut être partiellement détruite pendant le traitement d'hydrolyse précédant le dosage lui-même. Puisque la laine, qui n'a pas été soumise à un traitement réducteur, ne contient que des traces de cystéine, nous avons adopté cette méthode, nous contentant de doser la somme de la cystéine et de la cystine (Soufre thiol + Soufre disulfure).

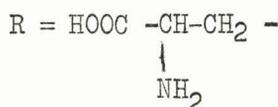
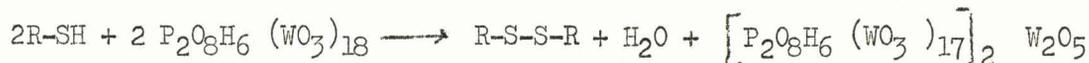
Principe.

Le groupement thiol de la cystéine est oxydé en disulfure par un excès d'acide phospho-18-tungstique, ce dernier étant réduit quantitativement en un composé d'un bleu intense, d'après la réaction:



L'intensité de la couleur bleue, qui peut être mesurée par une des méthodes colorimétriques habituelles, est alors proportionnelle à la quantité présente de soufre thiol.

Lorsqu'on veut doser la cystine, on la fait réagir simultanément avec du bisulfite de sodium et l'acide-18-phosphotungstique; il se produit alors les réactions suivantes :



Ces équations montrent qu'une mole de complexe coloré est formée à partir de deux moles de cystine, mais une mole de cystine est formée à nouveau et cette dernière peut à son tour réagir avec le bisulfite de sodium et l'acide phospho-18-tungstique. Finalement, une mole de cystine donne une mole de complexe coloré.

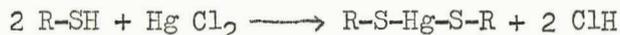
Lorsque l'hydrolysats contient à la fois de la cystéine et de la cystine, elles peuvent être dosées en utilisant le fait qu'une mole de thiol donne une mole de complexe coloré en présence de bisulfite de sodium

(voir réactions page précédente), tandis qu' une demi-mole seulement est formée en l'absence de ce dernier.

On a par conséquent :

- 1) En présence de bisulfite de sodium  
(complexe coloré) = (R-SH) + (R-S-S-R)
- 2) En l'absence de bisulfite de sodium  
(complexe coloré) = 1/2 (R-SH)

Pratiquement les hydrolysats de protéine contiennent des agents réducteurs, autres que la cystéine, qui sont capables de développer une coloration bleue avec l'acide-l8-phosphotungstique; de plus, comme l'ont montré KOLB et TOENNIS (4) le bisulfite de sodium lui-même produit lentement cette même coloration en présence du réactif; il est donc nécessaire d'effectuer une correction. Celle-ci est déterminée en se basant sur le fait que la cystéine réagit avec le chlorure mercurique d'après la réaction :



Ce mercaptide ne développant pas de coloration avec l'acide-l8-phosphotungstique, toute coloration formée est due à des agents réducteurs étrangers. Il suffit donc d'effectuer simultanément deux essais : l'un, appelé " blanc", en présence de chlorure mercurique, et l'autre en l'absence de ce réactif; en déduisant de l'intensité de coloration de ce dernier celle donnée par le "blanc", il est possible d'évaluer la somme cystéine-cystine en présence d'autres réducteurs.

#### Réactifs.

1- Solution de référence de L-cystine (+)  $5 \times 10^{-3}$  M., dans ClH 0,2 N.

2- Tampon acétate.

Acétate de sodium cristallisé 357 g.

Soude en écailles 15 g.

sont dissous dans de l'eau distillée. On amène à un litre.

10 ml de cette solution tamponnent, au pH 5,1, 10 ml d'un hydrolysats chlorydrique 1 N.

(+) L-cystine de HOFFMANN-LAROCHE

3- Solution de bisulfite de sodium 1 M.

Cette solution est faite avec du bisulfite de sodium 35° B. et ajustée par dosage iodométrique.

Sa conservation à l'abri de la lumière est d'environ un mois.

4- Solution de chlorure mercurique 0,1 M.

5- Réactif phosphotungstique.

L'acide phospho-18-tungstique a été préparé d'après les indications de CRISTOL (5).

Dans un ballon de 1 litre muni d'un réfrigérant à reflux, dissoudre à chaud 250 g de  $P_2O_8 Na_6 (WO_3)_{24} \cdot n \cdot H_2O$  dans 25 ml d'eau distillée et suffisamment de  $PO_4H_3$  à 85 % pour neutraliser le mélange, puis ajouter un excès de  $PO_4H_3$  d'environ 50 ml. Porter doucement à l'ébullition et maintenir celle-ci pendant huit heures; le mélange prend une teinte foncée, due à la formation de dérivés d'oxydes inférieurs de tungstène. Réoxyder par 5 ml d'eau de brome et concentrer la solution jaune obtenue jusqu'à consistance sirupeuse; par refroidissement, la solution se sépare en une couche supérieure claire, renfermant l'excès de  $PO_4H_3$  et le phosphoduodécitungstate de sodium non transformé, et en une couche jaune inférieure bientôt en voie de cristallisation correspondant au phospholutéotungstate de sodium. Après refroidissement complet, isoler les cristaux jaunes par filtration sur entonnoir de porcelaine filtrante et les recristalliser dans le minimum d'eau. Le phospholutéotungstate de sodium répond à la formule  $P_2O_8 Na_6 (WO_3)_{18} \cdot 22 H_2O$  et se présente sous forme de cristaux jaune citron, très solubles dans l'eau.

Nous avons utilisé comme réactif, une solution renfermant 0.35 mole de  $WO_3$  par litre soit 95 g. de phospholutéotungstate de sodium.

La conservation de cette solution est de plusieurs mois.

Mode opératoire.

Il comporte 2 opérations distinctes

- a) Hydrolyse de la protéine
- b) Dosage du Soufre (thiol + disulfure) sur l'hydrolysat protéique.

a) Hydrolyse de la protéine.

0,1 g de laine ou de protéine est hydrolysé durant 4 heures au réfrigérant à reflux ( joints rodés) par 20 ml. ClH 5N, la solution est ensuite étendue à 100 ml.

Lorsque le dosage est effectué sur des hydrolysats partiels de laine, on détermine, par le dosage d'azote, la quantité d'hydrolysate qu'il faut prélever pour qu'il contienne 100 milligrammes de protéine et on lui ajoute une quantité calculée de ClH et d'eau pour obtenir finalement 20 ml de ClH 5N; après hydrolyse on complète également à 100 ml

b) Détermination du Soufre (thiol + disulfure).

On exécute parallèlement l'essai à blanc et le dosage proprement dit.

Essai à blanc.

Dans une fiole jaugée de 50 ml on introduit successivement et dans l'ordre :

10 ml de Tampon acétate.  
3 ml de solution de bisulfite de sodium.  
10 ml d'hydrolysate à doser.  
3 ml de solution mercurique.

Après 4 minutes :

4 ml de Réactif phosphotungstique.

On complète à 50 ml

Dosage.

Dans une fiole jaugée de 50 ml on introduit les mêmes quantités de réactifs, mais on omet d'ajouter la solution de chlorure mercurique.

On laisse la coloration se développer 20 minutes et on lit les intensités de coloration à l'électrophotomètre MEUNIER, en se servant du filtre 65. L'intensité de référence est celle donnée par 1 ml de la solution de L-cystine  $5 \times 10^{-3}$  M.

IV ) Dosage de la Tyrosine.

Nous avons utilisé une modification de la méthode de LUGG (1937) (6).

Principe.

On évalue à l'aide d'un électrophotomètre l'intensité de la coloration rouge que donne la Tyrosine avec le réactif de MILLON.

Réactifs.

I- Solution de référence de L-Tyrosine.

$5 \times 10^{-3}$  M. dans  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1 N

2- Solution A.

Acide sulfurique 5 N.

3- Solution B.

Dissoudre dans l'eau distillée :

Sulfate Mercurique	75 g.
Chlorure Mercurique	55 g
Sulfate de sodium anhydre	70 g.
Acide sulfurique 66 ° B.	125 g

Compléter à 1 litre.

4- Solution C.

Solution B 500 ml.

Acide sulfurique 1 N. 500 ml.

5- Solution D.

Dissoudre dans 600 ml d'eau distillée :

Sulfate Mercurique	12 g
Chlorure Mercurique	9 g
Acide sulfurique 66°B.	100 g.

Ajouter ensuite:Acide sulfurique 66°B. 500 g

Compléter à 1 litre après refroidissement.

## 6- Solution E.

Nitrite de sodium IM.

### Mode opératoire.

Il comporte deux parties :

#### 1) Hydrolyse de la Protéine.

0,1g de laine ou de protéine est hydrolysé durant 6 heures au réfrigérant à reflux (joints rôdés) par 10 ml  $\text{SO}_4\text{H}_2$  5N. (solution A), la solution est ensuite amenée à 25 ml.

#### 2) Détermination de la Tyrosine.

Dans une fiole de 25 ml, on introduit 5 ml de l'hydrolysate sulfurique précédent et 5 ml de la solution B; on porte la fiole au bain-marie à 60/65°C. pendant 30 minutes. On la laisse ensuite refroidir, pendant une heure, dans un bain d'eau froide et on filtre dans une fiole jaugée de 25 ml pour éliminer le précipité qui s'est formé. On lave le filtre, en plusieurs fois, avec 10 à 12 ml de la solution C, et on recueille ces solutions de lavage dans la fiole jaugée, on complète à 25 ml avec la solution C, et on ajoute alors 0,5 ml de la solution E. Il se développe une belle coloration rouge. Après 2 minutes on lit l'intensité de la coloration à l'électrophotomètre MEUNIER en se servant du filtre 46.

Pour tenir compte, éventuellement, de la coloration jaunâtre de l'hydrolysate, on fait un essai "à blanc" dans lequel on omet d'ajouter les 0,5 ml de la solution de nitrite.

L'intensité de référence est celle donnée par 1 ml de la solution de L-Tyrosine  $5 \times 10^{-3}$  M.

## V ) Chromatographie de partage sur papier.

Cette méthode a été décrite pour la première fois en 1944, par GORDON, MARTIN, SYNGE et CONSDEN (7). Nous rappellerons brièvement son principe. La séparation des différents constituants du mélange est fondée sur leurs coefficients de partage différents, entre deux phases liquides: l'une aqueuse, l'autre organique. La phase aqueuse est stationnaire et retenue sur un

support solide (la feuille de papier), la phase organique est mobile le long du support; il y a, en quelque sorte, lixiviation de la première par la seconde, et les différents composants du mélange à séparer sont entraînés par la phase mobile, d'autant plus rapidement qu'ils y sont plus solubles.

On appelle  $R_f$  d'une substance le rapport de la distance parcourue par celle-ci depuis sa ligne de départ à la distance parcourue par le solvant.

Chaque amino-acide ou polypeptide, pour un système solvant donné et dans des conditions expérimentales identiques, peut donc être caractérisé par son  $R_f$ .

Au cours de notre travail, nous avons utilisé le papier Whatman n°1 et comme solvants : le phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale, et le mélange butanol/acide acétique/eau.

Le phénol saturé d'eau s'obtient en agitant dans une ampoule à décanter du phénol avec un excès d'eau; on laisse décanter assez longtemps, et la couche de phénol saturé d'eau est soutirée. Le mélange butanol/acide acétique (PARTRIDGE 1948) (8), se prépare de la façon suivante : dans une ampoule à décanter, on verse 40 ml de n-butanol, et 10 ml d'acide acétique cristallisable. Après agitation, on ajoute 50 ml d'eau distillée et on agite énergiquement. On laisse décanter une demi-journée et on récupère la couche supérieure homogène.

A la fin de la chromatographie, le papier est séché à l'étuve vers 100/105° C. et révélé par la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène) à 0,1% dans le butanol saturé d'eau. Le chromatogramme est développé rapidement à l'étuve entre 80 et 100° C; lorsqu'il y a de petits peptides, le temps de chauffage doit être plus long. La lecture du chromatogramme se fait immédiatement en lumière transmise, et on affecte alors chaque tache d'un coefficient estimé d'après l'intensité de coloration et la surface des taches révélées à la ninhydrine (DENT) (9).

Pour chaque chromatogramme, on peut ainsi établir un tableau des proportions relatives des différents acides aminés. Les chromatographies en deux dimensions ont été réalisées avec comme premier solvant le système butanol/acide acétique/eau, le deuxième solvant étant constitué par le système phénol/ammoniaque (3%).

## VI) Chromatographie sur résines à échange d'ions.

Nous avons été amenés à utiliser les résines à échange d'ions pour la séparation des hydrolysats partiels acides ou enzymatiques de laine, en vue de leur étude par la chromatographie sur papier. Les résines à échange de cations sous forme  $H^+$  ( type polystyrène sulfoné : Amberlite I.R.C 120, Dowex 50) fixent tous les amino-acides qui peuvent être élués par des solutions ammoniacales diluées. Après concentration de l'éluat ammoniacal, on obtient une solution d'acides aminés, parfaitement déminéralisée, qui peut être étudiée finalement par la chromatographie sur papier.

Les résines à échange d'anions (type Déacidite 200, Amberlite IR 4 B) fixent les acides aminés dicarboxyliques et les peptides acides. L'éluution par l'acide acétique  $N/10$  ou  $N$ , par l'acide chlorhydrique, permet de déplacer sélectivement les composés à caractère acide.

Sur le plan technique, les hydrolysats sont d'abord passés sur une colonne remplie d'une résine à échange de cations. ( Permutite 50 ou Amberlite IRC 120 : grains 50-100), régénérée par de l'acide chlorhydrique  $2 N$ , et lavée abondamment avec de l'eau distillée. Après écoulement lent de l'hydrolysate sur la colonne ( quantité de résine variable, suivant l'hydrolysate, de 20 à 50 g.), la résine est lavée avec de l'eau distillée; enfin, l'éluution est réalisée successivement avec des solutions d'ammoniaque  $0,3 N$  et  $2 N$ . L'éluution de la plus grande partie des acides aminés coïncide avec le passage de l'ammoniaque au bas de la colonne ( voir à ce sujet BOULANGER et BISERTE) (10).

L'éluat ammoniacal qui contient tous les acides-aminés, à l'exclusion de tous les cations minéraux, est concentré soit par distillation à  $37^{\circ}C$ . sous pression réduite, soit par ventilation d'air froid. Certains peptides à caractère acide ne sont pas retenus par cette résine à échange de cations; ils se retrouvent dans le premier effluent, ainsi que dans le liquide de lavage qui suit l'écoulement de l'hydrolysate. On fait alors passer cet effluent sur une résine à échange d'anions (Déacidite 200 ou Amberlite IR 4 B : grains 50-100, régénérée à l'acétate de sodium  $N/4$ ). Les peptides acides fixés sur la colonne sont élués sélectivement et successivement par des solutions d'acide acétique  $N/10$ ,  $N/1$  et d'acide chlorhydrique  $N/4$ . Les divers éluats ainsi obtenus sont concentrés sous pression réduite à  $37^{\circ}C$ .(voir à ce sujet BISERTE, BOULANGER et COURTOT) (11).

## CHAPITRE II

### HYDROLYSE CHIMIQUE MENAGÉE EN MILIEU ACIDE FAIBLE,

#### NEUTRE ET ALCALIN

Lorsque nous avons entrepris ce travail, plusieurs auteurs venaient de montrer que certains amino-acides étaient libérés préférentiellement au cours de l'hydrolyse ménagée des protéines.

PARTRIDGE et DAVIS (1950) (12) avaient mis en évidence que l'acide aspartique était le premier amino-acide libéré de substrats protéiques tels que l'ovalbumine, la gélatine, l'insuline, au cours de l'hydrolyse par l'acide oxalique 0,25 M. BLACKBURN (13) opérant sur la laine, avait signalé que pour de faibles concentrations en ions hydrogène, l'acide aspartique est détaché le plus rapidement, tandis que d'autres amino-acides, notamment le glycocolle, apparaissent quand la concentration de l'acide augmente. DESUNELLE et BONJOUR (1950) (14) avaient insisté, au contraire, sur la moindre résistance des liaisons du glycocolle au cours de l'hydrolyse alcaline.

Nous nous sommes donc proposé de préciser les modalités de la libération des amino-acides et des peptides au cours des hydrolyses ménagées en milieu acide fort, acide faible, neutre et alcalin. Comme d'autre part il nous semblait intéressant de connaître le genre d' "altération" que subit la laine par hydrolyse dans le processus de teinture, nous avons souvent choisi des conditions expérimentales qui se rapprochent de celles utilisées lors de l'application des colorants sur la fibre (+) (PIGACHE et BISERTE 1951) (15).

---

(+) Nos milieux d'hydrolyse ont des compositions voisines des "bains" utilisés en teinture mais ils ne contiennent ni colorants (teinture à blanc) ni sulfate de soude. Ce dernier composé a pour rôle de retarder la montée du colorant sur la fibre; récemment PERYMANN (1954) (16) a montré que le sulfate de soude, pour des concentrations allant jusqu'à 9,2 g/l, avait peu d'action sur la laine dans des conditions de pH allant de 1,7 à 6,8.

Nous pensons donc que nos résultats auraient été pratiquement identiques avec de véritables "bains de teinture", l'hydrolyse de la laine étant fonction uniquement du pH, de la température du milieu, et du temps de traitement.

Afin de mieux préciser l'importance de cette " altération " par hydrolyse, nous avons suivi les taux d'azote et de soufre ( thiol + disulfure ) solubilisés.

A ) HYDROLYSE EN MILIEU ACIDE FAIBLE OU NEUTRE.

1) Conditions expérimentales.

Des échantillons de 5 g. (poids anhydre) de laine ( tissu léger ) sont traités à l'ébullition, sous réfrigérant à reflux, pendant des temps variables, par 100 ml des milieux suivants : (+)

n°1 - acide acétique M/50 ( pH 3,2 ) ( quantité d'acide calculée par rapport au poids de laine anhydre : 2,4 % ).

n°2 - solution de bichromate de potassium M/200 et d'acide sulfurique M/66 ( pH 1,8 ) ( soit 3 % d'acide sulfurique et 2,94 % de bichromate de potassium par rapport au poids de laine anhydre.

n°3 - Solution de bichromate de potassium M/200 ( pH 4,5)

n°4 - eau distillée bouillie.

L'hydrolysat est ensuite filtré bouillant sur un entonnoir en verre fritté n°4, pour éliminer les fibres de laine en suspension. Au cours de tous ces traitements, il se produit, lors du refroidissement de l'hydrolysat, un très léger précipité blanc gélatineux (++)).

D'autre part, il faut noter qu'en même temps on observe des variations de pH, celles-ci sont dues à la salification de l'acide par les groupements basiques de la laine et de ses produits de dégradation, dans le cas des solutions contenant du bichromate de potassium ces variations sont plus importantes, car le chrome se fixe sur la laine à l'état de  $Cr_2O_3$  et une certaine quantité de potasse est libérée, ce qui tend à augmenter l'alcalinité ( CARLEME, ROWE et SPEAKMAN 1946 ) (17)..

---

(+) Le milieu n°1 est utilisé dans la teinture des " colorants foulons".

Les milieux n°2 et 3 sont utilisés dans la teinture des " colorants chromatables ".

(++) Voir à ce sujet les travaux de ZAHN ( 1950 et 1955 ) (18 et 19) sur les " gélatines de laine " extraites par l'eau bouillante.



## 2) Résultats expérimentaux.

### a) Cinétique de la libération d'azote et de soufre.

La solubilisation de la laine au cours de ces différentes hydrolyses est faible ( 0,8 à 1,2 % d'azote solubilisé pour des temps d'action de 3 à 4 heures ) ( voir tableau I ).

Etant donné la faible quantité de produits dissous, le dosage du soufre cystinique dans l'hydrolysats n'a pas été effectué, et l'on s'est contenté de doser le soufre ( thiol + disulfure ) dans les laines ayant subi l'action des différents agents chimiques. A ce sujet, il est possible de classer les résultats en deux catégories ( voir tableau I ) : les laines traitées en milieu acide ( acide acétique et bichromate sulfurique ) ne subissent pas de variations dans leur teneur en soufre cystinique; celles qui ont été traitées en milieu neutre perdent au contraire une quantité importante de soufre ( thiol + disulfure ) et l'hydrolysats contient une certaine quantité d'hydrogène sulfuré.

Dans ce cas, la diminution du soufre cystinique résulte d'une transformation de la cystine en lanthionine ( CUTHBERTSON, PHILLIPS 1945 ) (20).

### b) Etude chromatographique.

Les différents hydrolysats, après passage sur Permutite 50, ont été étudiés en chromatographie bidimensionnelle.

Le tableau II résume les principaux résultats obtenus. L'examen de ce tableau montre de façon très nette la libération précoce et importante de la sérine et du glyco-colle, et à un degré moindre, de l'alanine et de l'acide glutamique. Il y a assez peu d'acide aspartique libéré, contrairement à ce qui se produit en milieu acide fort ( voir 2ème partie, chapitre III ).

D'autre part, il est intéressant de signaler l'apparition de la cystine ou de ses produits de décomposition. Tous les hydrolysats contiennent aussi une certaine quantité de petits peptides : en effet, après hydrolyse totale, il est possible de déceler en chromatographie bidimensionnelle, de très nombreux amino-acides qui n'existaient pas sur les chromatogrammes directs.

Un ensemble de polypeptides ont pu enfin être identifiés; ils possèdent les caractéristiques chromatographiques suivantes :

R<sub>f</sub> (Butanol-acide acétique) : 0,28 et R<sub>f</sub> (phénol-NH<sub>3</sub> 3 %) : 0,82

## T A B L E A U - I

## HYDROLYSE EN MILIEU ACIDE FAIBLE OU NEUTRE.

Milieu d'hydrolyse	Durée (en heures)	pH	N solubilisé (en %)	S-(thiol + disulfure) de la laine traitée (en % du poids sec)
CH <sub>3</sub> COOH M/50	0	3,2	-	3,24
	1	4,15	0,27	3,21
	2	4,25	0,33	3,21
	4	4,4	0,73	3,21
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> K <sub>2</sub> M/200 + SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> M/66.	0	1,8	-	3,24
	1	3,7	0,48	-
	2	4,1	0,57	-
	3	4,4	0,81	3,20
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> K <sub>2</sub> M/200	0	4,5	-	3,24
	1/2	7,0	0,32	-
	1	7,1	0,49	2,91
	2	7,1	0,60	-
	3	7,3	1	2,57
Eau distillée	0	6,4	-	3,24
	1/2	7,0	0,54	2,85
	3	7,0	0,81	2,57
	4	7,0	0,81	2,54
	9	7,0	0,81	2,30
	17	7,0	2	2,20

TABEAU II

HYDROLYSE EN MILIEU ACIDE FAIBLE ET NEUTRE.  
PROPORTIONS RELATIVES DES AMINO-ACIDES LIBERES. (+)

Milieu d'hydrolyse	Durée (en h.)	Gly-cocolle.	Sérine	Acide Glutamique	Alanine	Acide Aspartique	Diaminés	Valine	Leucine	Thréonine	Tyrosine	Cystine
CH <sub>3</sub> COOH N/50	1	10	8	1	5	1	1					1
	2	15	12	7	5	3	2	2	2	2	traces	2
Bichromate sulfurique	1	8	6	2	2	traces	2					
	3	10	8	2	2	1	4			1	traces	
Bichromate M/200	1	7	7	2	3	traces	3	traces				
	2	10	10	3	2	"	2	"		1		
Eau distillée	1/2	6	4		2		3	traces	traces		traces	
	17	20	10	3	6	traces	10	3	"	3	5	

(+) Les chiffres représentent les proportions relatives des amino-acides estimées d'après la surface et l'intensité des taches révélées à la ninhydrine (DENT 1948) (21).



B ) HYDROLYSE EN MILIEU ALCALIN.

Des échantillons de 5 g ( poids anhydre) de laine sont traités à la température du laboratoire ( 20/22° C.), par 300 ml de solutions de soude  $\underline{N}/20$ ,  $\underline{N}/10$  et  $\underline{N}/5$ : Au cours de ce traitement, il y a solubilisation d'une quantité importante de la laine ( voir azote solubilisé), tandis que le soufre ( thiol + disulfure ) de la laine traitée diminue très nettement ( Tableau III). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de CUTHBERTSON, LINDLEY et PHILIPPS (1945)(22 et 23 ).

TABLEAU III

HYDROLYSE PAR LA SOUDE.

Laine Mérinos 100-105 : S ( thiol + disulfure ) : 3,24 %.

	Durée de l'hydrolyse (en heures)	N solubilisé en %	S ( thiol + disulfure) de la laine traitée (en % du poids sec )
Na OH $\underline{N}/10$	24	2,55	2,02
	48	7,90	1,73
Na OH $\underline{N}/5$	24	6,4	1,43
	48	19,8	1,14

Les hydrolysats sodiques ne laissent pas déposer de précipité directement comme les hydrolysats acétiques ou sulfuriques ( voir plus loin), mais seulement après neutralisation de la soude.

L'étude chromatographique des amino-acides libérés permet de conclure à la prédominance du glycoColle et de la sérine, et à un degré moindre des diaminés (+). Il semble que le glycoColle soit détaché en plus grande quantité que la sérine au cours des premiers stades de l'hydrolyse (Tableau IV).

(+) Il s'agit principalement d'arginine.

Dans le chromatogramme bidimensionnel, il existe aussi des plages présentant une réaction positive à la ninhydrine, qui correspondent à des polypeptides. L'un de ceux-ci, qui se localise parfaitement, possède les caractéristiques chromatographiques suivantes :  $R_f$  (butanol/acide acétique) : 0,205, et  $R_f$  ( phénol -NH<sub>3</sub> 3 % ) 0,90.

Après récupération sur papier de ces polypeptides, et hydrolyse totale, il est possible d'identifier la plupart des amino-acides avec toutefois une prédominance d'acide glutamique et de glycocolle.

TABLEAU IV

HYDROLYSE EN MILIEU ALCALIN.

PROPORTIONS RELATIVES DES AMINO-ACIDES LIBERES.

Milieu d'hydrolyse	Durée (en h.)	Gly-cocolle	Sérine	Diaminés	Alanine	Acide Glutamique	Acide Aspartique	Thréonine	Tyrosine	Valine	Leucine	Cystine
Na OH N/20	24	10	7	3	1	tra- ces			tra- ces	tra- ces	tra- ces	
Na OH N/10	48	10	10	4	3	1	1	2				
Na OH N/5	24	6	3	1	tra- ces	tra- ces						
	48	12	12	12	1	3	1	1				
	72	30	20	+++ (°)	4	6	2	2			1	tra- ces

(°) Il est difficile d'apprécier l'importance de la zone des diaminés, qui est occupée par une large plage donnant une réaction intense à la ninhydrine et ne présentant pas de limites précises.

C ) CONCLUSIONS.

Les propriétés physico-mécaniques des fibres de laine, notamment leur ténacité à la traction et leur allongement de rupture, sont conditionnées par l'intégrité des liaisons disulfures et des liaisons peptidiques.

ELOD, NOWOTNY et ZAHN ( 1940, 1942 ) (24) ont notamment montré que la rupture d'un nombre relativement petit de liaisons peptidiques provoquait un affaiblissement déjà marqué des fibres.

Il ressort donc très nettement de nos résultats que ce sont les milieux faiblement acides ( pH 4 à 4,5) qui ménagent le mieux la laine, puisque, même au bout de 4 heures d'hydrolyse à l'ébullition, la teneur en cystine n'a pas varié et la solubilisation d'Azote reste faible ( 0,73 %).

L'eau bouillante ne provoque qu'une solubilisation faible de l'Azote, mais par contre produit une hydrolyse très nette des ponts disulfures.

Quant aux solutions sodiques, à froid, de faible concentration ( N/5 et N/10), elles provoquent une hydrolyse déjà importante des liaisons peptidiques et une diminution très marquée des liaisons disulfures.

HARRIS et SMITH (1936) (25) ont d'ailleurs proposé un test de "solubilité alcaline " pour déterminer l'étendue de l'altération qu'a subi une laine au cours des différents traitement industriels (+). La solubilité alcaline augmente lorsque la laine a subi au préalable un traitement qui provoque une rupture des liaisons peptiques ou des liaisons disulfures. VAN OVERBEKE, LEFEBVRE et RAUX (1950) (26) et LEES et ELSWORTH (1952) (27) ont montré que ce test pouvait être difficilement reproductible, car la quantité de laine qui entre en solution sous l'influence des alcalis, dépend essentiellement des conditions opératoires et de l'état sous lequel se trouve la fibre ( fil, tissu, etc...). Par ailleurs le test perd toute signification si la laine a subi une hydrolyse des liaisons peptidiques au cours d'un traitement alcalin. Nos propres expériences, bien qu'effectuées dans des conditions

---

(+) Ce test consiste à évaluer la perte de poids que subit une laine par traitement dans la soude N/10 à 65° C. durant une heure.

assez différentes, montrent également qu'un "test de solubilité alcaline " ne peut pas apporter de résultats bien précis sur l'étendue de l'altération d'une laine, puisque la vitesse de solubilisation augmente avec le temps (+).

Nos résultats montrent par ailleurs, qu'en milieu acide faible ou alcalin, c'est essentiellement le glyocolle et la sérine qui sont libérés à l'état d'acides libres, ce qui indique une certaine spécificité de ces milieux d'hydrolyse; nous avons également observé une libération préférentielle de glyocolle et de sérine lors de l'hydrolyse alcaline de la DNP-laine.

Enfin, il est intéressant de souligner que, contrairement à ce qui a souvent été supposé, le bichromate de potassium dans les conditions utilisées lors du mordantage de la laine, n'oxyde pas les liaisons disulfures.

---

(+) Dans la soude N/5 il y a 3 fois plus d'azote solubilisé en 48 heures qu'en 24 heures.

CHAPITRE 111

HYDROLYSE MENAGEE DE LA FIBRE DE LAINE  
PAR L' ACIDE SULFURIQUE DECINORMAL (+).

A- Conditions expérimentales

a) Hydrolyse d'une durée inférieure à 8 heures.

Des échantillons de 5 g de laine (poids anhydre) sont traités à l'ébullition sous réfrigérant à reflux par 100 ml d'acide sulfurique N/10 (quantité d'acide égale à 9,8 % du poids de laine) pendant des temps variables. L'hydrolysate est ensuite filtré bouillant sur un entonnoir en verre fritté n°4 pour éliminer la laine restante.

Les différents hydrolysats ainsi obtenus se troublent progressivement au cours du refroidissement. Après un repos d'une nuit, ils laissent déposer un précipité blanc gélatineux pour lequel nous avons adopté la dénomination de : " polypeptides thermosolubles de laine ", la caractéristique essentielle de ce groupe de constituants azotés consistant, en effet, en une thermosolubilité en milieu acide. Lorsque l'on veut isoler uniquement ce groupe de polypeptides, l'ensemble de l'hydrolysate, y compris le précipité, est dialysé contre l'eau courante afin d'éliminer toute trace d'acide sulfurique; dans ces conditions la précipitation du groupe de " polypeptides thermosolubles " s'intensifie très nettement. Après dialyse, les précipités sont recueillis par centrifugation, lavés à l'eau glacée, à l'alcool et à l'éther, et séchés.

La laine restante après hydrolyse est rincée abondamment à l'eau courante, neutralisée pendant une nuit à l'aide d'une solution aqueuse à 1 % de pyridine, rincée ensuite à l'eau courante et à l'eau distillée et finalement séchée.

---

(+) La grande majorité des colorants pour laine sont appliqués sur la fibre en présence d'acide sulfurique et à l'ébullition; la concentration en acide du "bain de teinture" est généralement voisine de N/30 pour les " colorants acides " et de N/10 pour les colorants dont la molécule est un complexe de chrome.

b) Hydrolyse d'une durée supérieure à 8 heures. (+)

Dans le cas des hydrolyses d'une durée supérieure à 8 heures, nous avons adopté, pour des raisons de commodité expérimentale, un mode opératoire légèrement différent.

Un échantillon de 100 g de laine ( poids anhydre) est hydrolysé à l'ébullition sous réfrigérant à reflux par 2 litres d'acide sulfurique N/10 pendant 8 heures. L'hydrolysate est ensuite filtré bouillant, et la laine restante est neutralisée, rincée et séchée comme nous l'avons dit plus haut. Cette laine restante est alors de nouveau hydrolysée pendant 8 heures par 2 litres d'acide sulfurique N/10, dans des conditions expérimentales identiques aux précédentes. Le deuxième hydrolysate est filtré, et la laine restante, après neutralisation, rinçage et séchage, est soumise de nouveau à l'hydrolyse. On recommence ce cycle d'opérations 8 fois de suite.

Si l'on désire isoler les " polypeptides thermosolubles ", on opère comme précédemment.

B- Résultats expérimentaux.

1) Cinétique de la libération d'azote et de soufre.

Les quantités d'azote et de soufre ( thiol + disulfure) solubilisées en fonction du temps sont indiquées dans le Tableau V.

---

(+) Nous nous étions primitivement assigné comme but d'étudier l'hydrolyse de la laine, par l'acide sulfurique décimormal, pour des temps d'action ne dépassant pas huit heures; cette étude nous ayant montré que la caractéristique essentielle de cette hydrolyse est sa nature préférentielle, nous avons alors pensé qu'il serait intéressant de voir si cette caractéristique se maintenait pour des temps d'hydrolyse nettement plus longs.

Durant les 40 premières heures de l'hydrolyse, la solubilisation de la laine (+) augmente proportionnellement à la durée du traitement; ensuite la quantité de laine solubilisée tend à diminuer légèrement. Les figures 7 et 8 permettent de saisir ces variations.

Cependant le phénomène le plus intéressant, mis en évidence au cours de cette étude cinétique, est la pauvreté relative en soufre (thiol + disulfure de la fraction solubilisée).

Les fractions solubilisées dans les deux premières heures de l'hydrolyse sont dix fois moins riches en soufre ( thiol + disulfure ) que la laine dont elles proviennent : en effet, alors que 3,2 % de l'azote initial ont été solubilisés en 2 heures, 0,3 % seulement du soufre ( thiol + disulfure ) est passé en solution.

TABLEAU - 5

( voir page suivante)

---

(+) On peut admettre que le dosage de l'azote est une mesure suffisamment précise du pourcentage de laine solubilisée : en effet, les teneurs en azote de la laine non traitée et de la laine hydrolysée pendant 64 heures, qui sont respectivement de 16,55 % et 14,85 %, restent très comparables; il faut d'ailleurs tenir compte, dans la diminution de l'azote total de la laine hydrolysée, de la disparition de l'azote amidé au cours de l'hydrolyse.

VAN OVERBEKE, MAZINGUE et DESPRETS (1954) (28) ont indiqué que dans les premiers temps de l'hydrolyse sulfurique, bien qu'il y ait solubilisation de peptides, la laine augmentait très légèrement de poids ( 1 % ) par suite de la fixation d'acide sulfurique sur la fibre.

TABLEAU - V

Cinétique de la solubilisation de l'azote et du soufre au cours des hydrolyses par l'acide sulfurique N/10.

(Laine " Mérinos 100 - 105 "; N total : 16,55 %, Soufre (thiol + disulfure) : 3,13 % )

a) <u>Hydrolyse d'une durée inférieure à 8 heures.</u> (+)		
Temps d'hydrolyse ( en heures )	N solubilisé (en % de N initial)	S (thiol + disulfure) solubilisé(en % de S initial).
1/2	0,85	---
1	1,4	0,16
1 1/2	2,2	0,25
2	3,2	0,30
3	4,7	---
4	5,9	0,88
6	7,0	1,32
b) <u>Hydrolyse d'une durée supérieure à 8 heures.</u>		
Après la 1ère hydrolyse	10,7	2,3
- 2ème -	23,7	7,5
- 3ème -	38,2	15,9
- 4ème -	51,8	24,6
- 5ème -	63,9	34,6
- 6ème -	72,5	41,9
- 7ème -	78,1	47,1
- 8ème -	83,4	54,3

(+) L'examen de ce tableau montre que des teintures prolongées en milieu trop acide, sont très préjudiciables pour la fibre. En effet, après 3 heures de traitement, la laine a déjà subi une " perte en poids " voisine de 5 %; de plus l'hydrolyse des liaisons peptidiques provoque un net affaiblissement de la résistance mécanique des fibres.

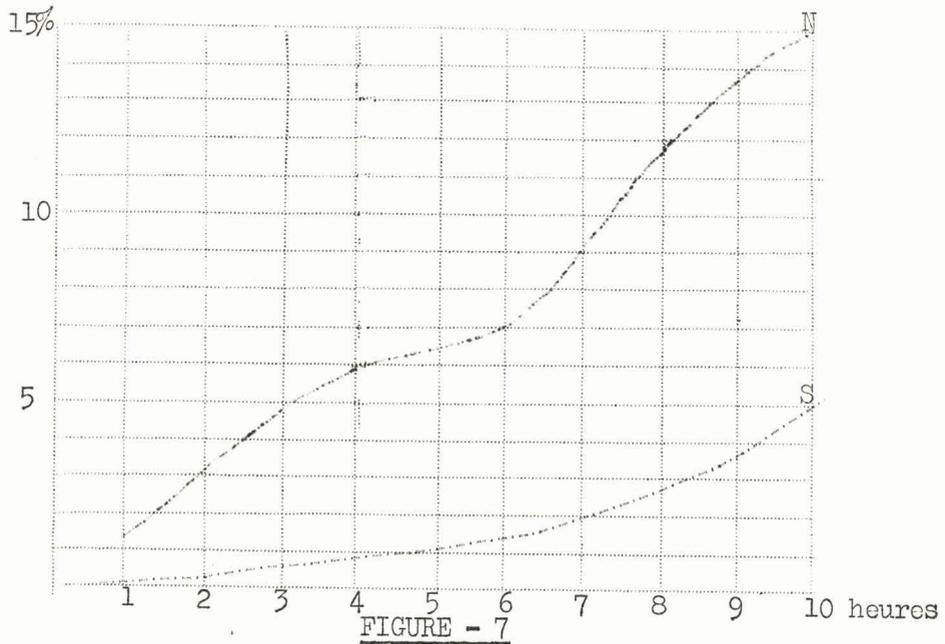


FIGURE - 7  
Variations de l'azote et du soufre solubilisés en fonction du temps.  
(1/2 à 10 heures)

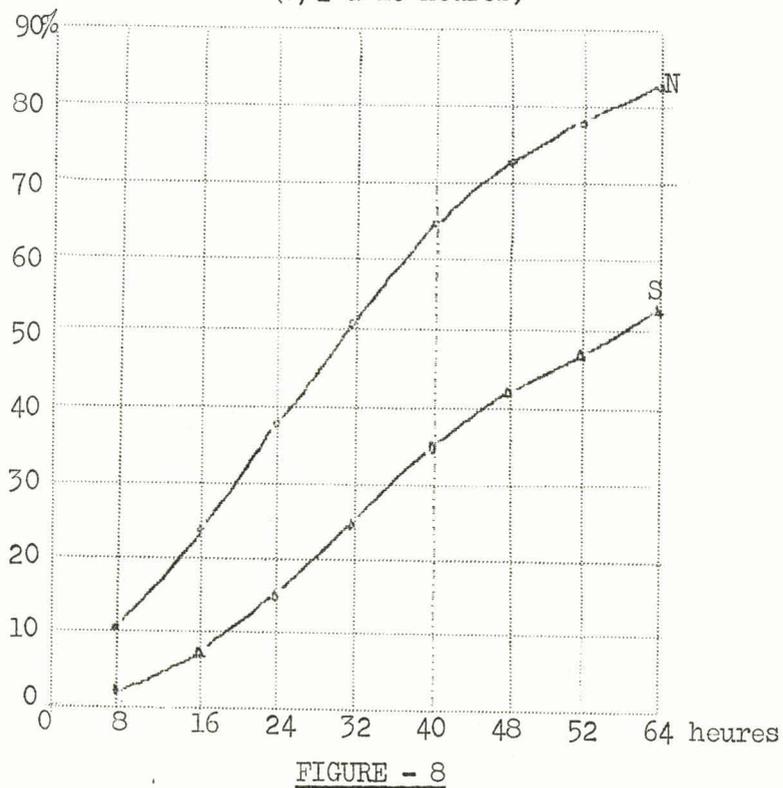


FIGURE - 8  
Variations de l'azote et du soufre solubilisés en fonction du temps.  
(8 à 64 heures)



Ce rapport diminue progressivement lorsque la durée de l'hydrolyse augmente ( après 8 heures le rapport  $\frac{N \text{ solubilisé}}{S \text{ solubilisé}}$  est égal à 5). Mais il est remarquable qu'après la quatrième hydrolyse de 8 heures, alors que la moitié de l'azote initial est déjà solubilisée les  $\frac{3}{4}$  du soufre se trouvent encore dans la fraction insoluble; de même, les 20% de laine non solubilisée après la huitième hydrolyse contiennent à eux seuls la moitié du soufre de la laine initiale ( voir figure 9).

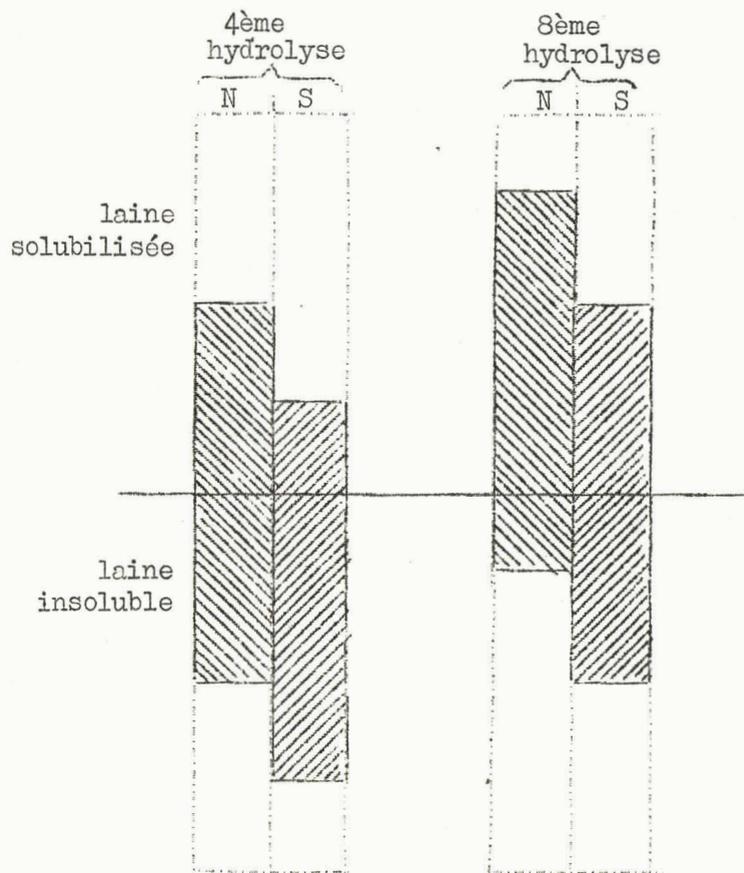


FIGURE - 9 .

Schéma montrant la répartition de l'azote et du soufre entre les fractions soluble et insoluble après 32 et 64 heures d'hydrolyse.

Ces résultats sont confirmés par ceux du tableau VI, qui montrent l'enrichissement en soufre ( thiol + disulfure ) de la laine restante au fur et à mesure de la progression de l'hydrolyse. En totalisant le soufre des fractions : soluble et insoluble ( voir tableau VII) on retrouve sensiblement - tout au moins pour les 5 premières hydrolyses de 8 heures - le soufre initial de la laine mise en expérience. Pour les dernières hydrolyses, la légère différence observée s'explique surtout par les pertes inévitables au cours des nombreuses manipulations.

Au cours de l'hydrolyse ménagée, on peut donc conclure que la cystine n'est pas modifiée et ne se retrouve pas dans la laine sous forme d'un dérivé qui ne serait pas dosable par la méthode de SHINOHARA.

TABLEAU - VI

Teneur en soufre ( thiol + disulfure ) de la laine soumise à l'hydrolyse ménagée, et des " polypeptides thermosolubles " formés.

Temps d'hydrolyse ( en heures )	Soufre de la laine traitée en p. 100.	Soufre des " polypepti- des thermosolubles recueillis en p.100
0	3,13	
1x8	3,56	0,96
2x8	3,89	1,42
3x8	4,24	1,63
4x8	4,66	2,34
5x8	5,06	2,53
6x8	5,34	3,45
7x8	5,87	4,29
8x8	6,20	5,28

TABLEAU - VII

Distribution du soufre (thiol + disulfure) entre les fractions soluble et insoluble, à différents stades de l'hydrolyse.

Temps d'hydrolyse (en heures)	Quantité de soufre solubilisé (en grammes p.100 g de laine initiale)	Quantité de soufre contenu dans la laine restante (en grammes p.100g de laine initiale)	Total pour 100 g de laine initiale
0		3,13	3,13
8	0,073	3,18	3,25
16	0,235	2,97	3,21
24	0,498	2,62	3,12
32	0,772	2,25	3,03
40	1,085	1,83	2,92
48	1,311	1,46	2,77
56	1,475	1,285	2,76
64	1,700	1,03	2,73

2) Etude chromatographique de la fraction " amino-acides " de l'hydrolysate.

Pour étudier cette fraction, on enlève le précipité thermosoluble par centrifugation à basse température.

Le reste de l'hydrolysate peut être fractionné par chromatographie sur résine à échange de cations en deux sous-groupes principaux ; le premier, qui n'est pas retenu sur la colonne de Permutite 50, contient, outre l'ion  $SO_4^{--}$ , la majorité des polypeptides (fraction peptidique de l'hydrolysate); le second obtenu après développement à l'ammoniaque, est constitué par des amino-acides libres et quelques polypeptides (fraction " amino-acide " de l'hydrolysate). Ces groupes ont été étudiés par chromatographie de partage sur papier.

Le tableau VIII rassemble schématiquement les résultats des divers chromatogrammes de la fraction " amino-acide " des hydrolysats. L'examen de ce tableau et des figures 10 et 11 ( chromatogrammes) montre de façon nette la libération préférentielle de l'acide aspartique et, à un degré moindre, du glycofolle et de la sérine. Cette libération préférentielle se maintient pendant toute la durée de l'action de l'acide sulfurique  $N/10$ ; cependant, au cours de la huitième hydrolyse de 8 heures, la prédominance de l'acide aspartique sur les autres acides aminés est moins évidente, car la laine soumise à l'hydrolyse contient de moins en moins d'acide aspartique ( voir plus loin). D'autre part, en ce qui concerne ce dernier hydrolysats, il faut encore insister sur la diminution de la sérine et de la tyrosine libres, sur l'apparition de la thréonine et de la cystine (+) et sur l'importance relative de la valine et de la leucine. La proline libre apparaît au cours de la sixième hydrolyse de 8 heures.

La fraction " amino-acide " contient également plusieurs polypeptides qu'il est difficile d'identifier sur les chromatogrammes, mais dont la présence est révélée par l'étude chromatographique après hydrolyse totale : on voit, en effet, apparaître de nombreux amino-acides qui n'existaient pas, ou seulement à l'état de traces, sur les chromatogrammes directs. Il est néanmoins possible de déceler, dès les premiers stades de l'hydrolyse ménagée, un polypeptide qui semble bien individualisé et qui possède les caractéristiques chromatographiques suivantes :  $R_f$  (butanol/acide acétique) = 0,33 ;  $R_f$  (phénol- $NH_3$  3 %) = 0,85.

TABLEAU - VIII

(voir page suivante)

---

(+) Il est vraisemblable que la cystine apparaît plus précocement dans les hydrolysats " ménagés ", mais le repérage de faibles quantités de cystine en chromatographie bi-dimensionnelle avec le butanol/acide acétique comme premier solvant et le phénol (  $NH_3$  3 % ) comme second solvant est très délicat.

TABLEAU - V111

Proportions relatives des amino-acides libérés au cours de l'hydrolyse par l'acide sulfurique décinormal.

Temps d'hydrolyse.	Acide Aspartique	Glycocolle	Sérine	Acide Glutamique	Alanine	Diaminés	Tyrosine	Thréonine	Valine	Leucine	Cystine
1/2 heure	6	4	3	2	tra- ces	tra- ces	-	-	-	-	-
1 -	8	6	5	2	2	2	-	-	-	-	-
2 -	12	8	6	2 (+)	2	3	-	-	-	-	-
10 -	30	10	8	2 (++)	3	3	1	tra- ces	tra- ces	tra- ces	-
(+++) 2° hydrolyse de 8 heures	20	6	10	1	2	2	2	-	-	2	-
6° -	30	10	15	8	3	4	1	-	2	6	-
8° -	12	8	tra- ces	8	4	5	tra- ces	4	3	6	1

(+) Les nombres représentent les proportions relatives des amino-acides estimés d'après la surface et l'intensité des taches révélées à la ninhydrine.

(++) La séparation de l'acide glutamique ainsi que son estimation sur les chromatogrammes bidimensionnels sont rendues délicates par la présence d'une quantité importante d'acide aspartique.

(+++)  
Il faut rappeler que, pour les hydrolyses d'une durée supérieure à 8 heures, la technique opératoire utilisée consiste à reprendre la laine qui vient de subir une hydrolyse de 8 heures et à l'hydrolyser de nouveau pendant le même temps par une nouvelle liqueur sulfurique N/10. On peut donc considérer que c'est chaque fois un nouveau substrat que l'on étudie; ceci explique que les derniers hydrolysats peuvent contenir certains amino-acides (aspartique notamment) en quantités moins importantes que les premiers hydrolysats.

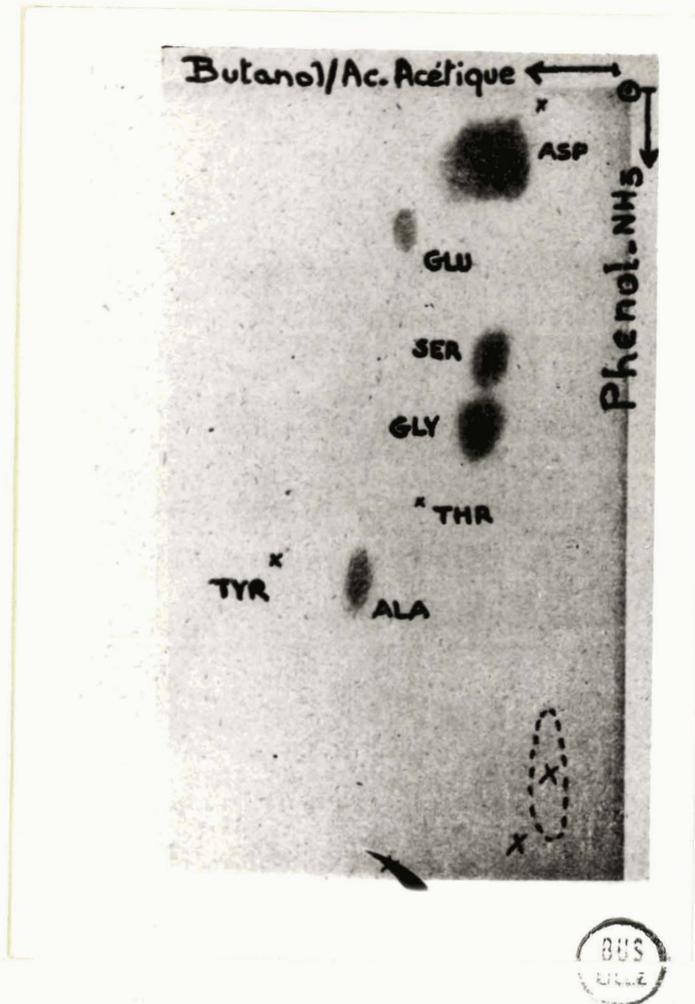


FIGURE - 10

Chromatogramme bidimensionnel de la fraction " amino-acide "  
d'un hydrolysate de huit heures.

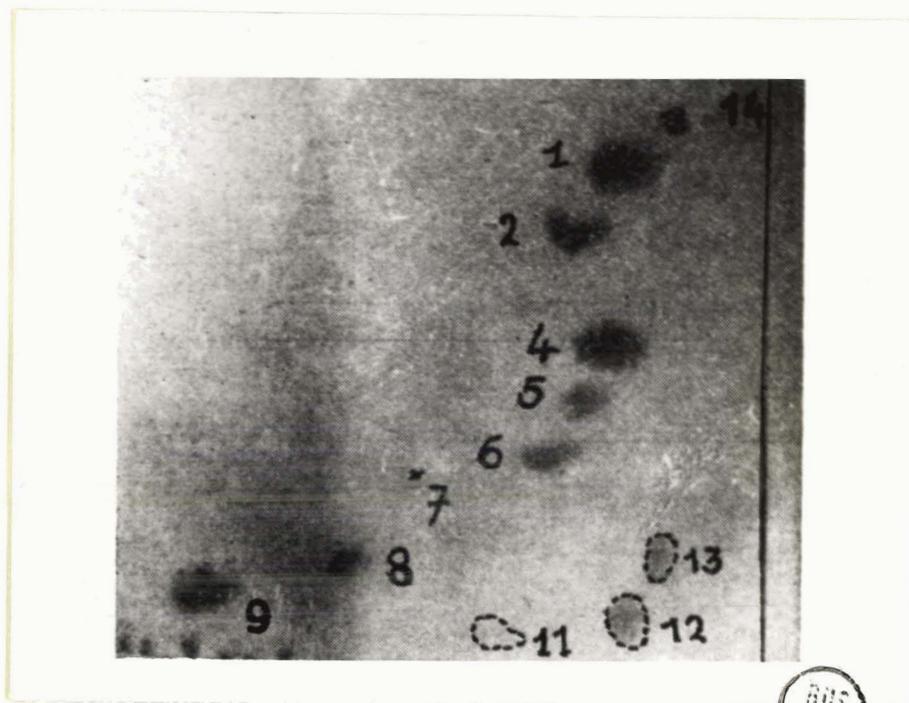


FIGURE - 11

Chromatogramme bidimensionnel des amino-acides libérés au cours de la huitième hydrolyse de huit heures. Les numéros portés sur la figure correspondent aux acides aminés suivants :

1: acide aspartique; 2: acide glutamique; 3: sérine ; 4 : glycocolle ;  
5: thréonine ; 6: alanine ; 7: tyrosine ; 8: valine ou méthionine ; 9: leucines;  
10: phénylalanine ; 11 : proline ; 12 : arginine ; 13 : lysine ; 14 : acide  
cystéique. : 15 : lanthionine ; 16 : autres dérivés de cystine.

3) Composition en amino-acides de la laine traitée par  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N/10.

Les tableaux VI<sup>r</sup> et IX montrent que la laine qui ne s'est pas solubilisée s'enrichit en soufre et s'appauvrit en tyrosine après chaque nouvelle hydrolyse. Ce résultat s'explique normalement par le fait que la fraction solubilisée au cours des premiers stades d'hydrolyse, - notamment le groupe des "polypeptides thermosolubles"-, est pauvre en soufre et riche en tyrosine ( voir figure 16).

Après 64 heures de traitement par l'acide sulfurique N/10, il est possible d'obtenir une laine "restante " dont la teneur en soufre est double de celle de la laine non traitée et dont le taux de tyrosine a diminué d'environ 50 %.(+)

Les variations de la teneur en cystine et en tyrosine sont nettement visibles sur les figures 12 et 13, qui représentent les chromatogrammes des hydrolysats totaux des laines traitées pendant 16 heures et 64 heures par l'acide sulfurique N/10.

Sur ces chromatogrammes, il est également intéressant de noter les variations quantitatives des autres amino-acides. Après 64 heures d'hydrolyse, l'acide aspartique, la sérine et le glycocolle ont très nettement diminué.

Ces trois amino-acides sont, comme nous l'avons vu précédemment, ceux qui sont libérés préférentiellement par l'hydrolyse acide ménagée.

---

(+) Nous avons observé que le résidu obtenu après 7 heures d'hydrolyse de la laine par l'acide sulfurique N/1 est également riche en soufre (5,28 %). A l'examen microscopique, on constate qu'il est constitué par des fragments de tubes et de très nombreux morceaux d'épicuticule.

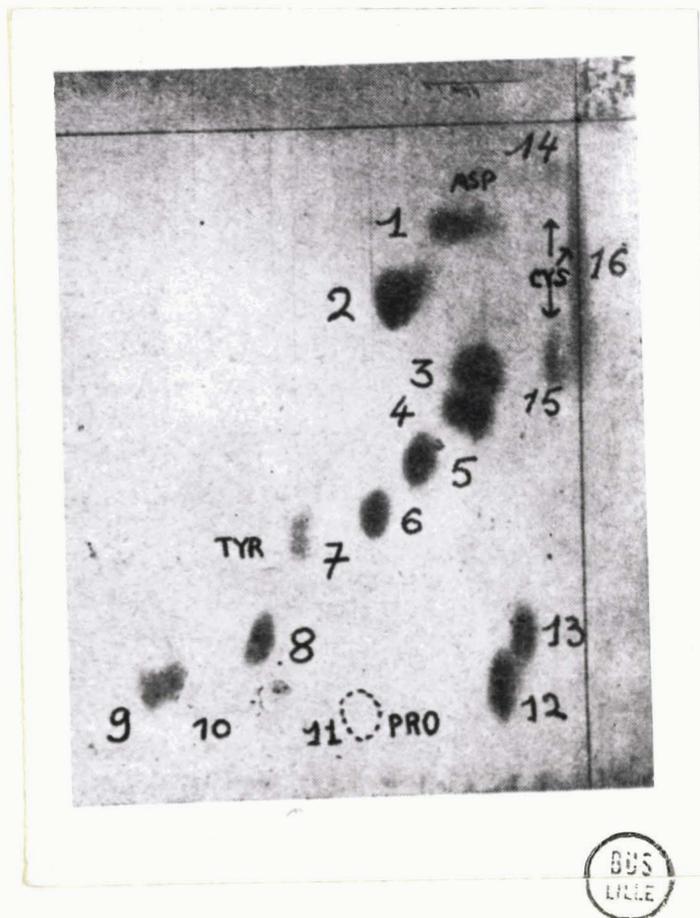


FIGURE - 12

Chromatogramme de l'hydrolysat de laine traitée pendant 16 heures par l'acide sulfurique décinormal. La numérotation des acides aminés est identique à celle de la figure 11.

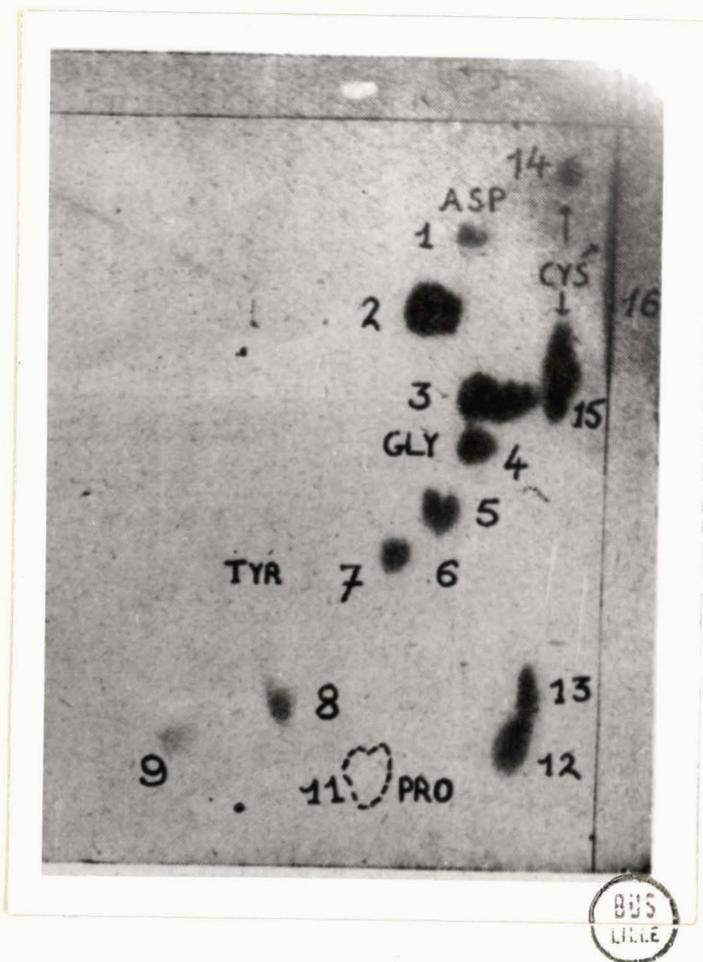


FIGURE - 13

Chromatogramme de l'hydrolysat total de laine traitée pendant 64 heures par l'acide sulfurique décinormal. La numérotation des acides aminés est identique à celle de la figure 11.

Les autres amino-acides subissent aussi très certainement des variations quantitatives, mais comme elles sont moins nettes, il faudrait pour les apprécier mettre en oeuvre des dosages suffisamment précis de chaque amino-acide.

C'est ce que nous avons réalisé pour l'acide aspartique et la proline.

La cinétique de la variation de composition en acide aspartique a été réalisée au moyen de l'étude densitométrique de la coloration à la ninhydrine des hydrolysats totaux de laines traitées. Ceux-ci sont séparés par électrophorèse sur papier à pH 3,9 en tampon pyridine/acide acétique. Après huit heures de passage du courant, l'acide aspartique est nettement séparé des acides aminés neutres et basiques. La coloration à la ninhydrine est réalisée suivant la technique de GRASSMANN et HANNIG (29), décrite pour le dosage photométrique des acides aminés. L'intensité de la coloration est lue au densitomètre Photovolt équipé d'un filtre vert à 530 m $\mu$ . La comparaison des laines traitées se fait par rapport à la laine intacte qui est prise comme base de référence ( voir figure 14).

L'étude cinétique de la variation en proline a été étudiée par chromatographie de partage sur papier dans le système butanol/acide acétique. La coloration est réalisée par la réaction spécifique de la proline à l'isatine et l'analyse densitométrique est également effectuée avec le densitomètre Photovolt équipé d'un filtre rouge à 600 m $\mu$ . La teneur en proline de la laine intacte est prise comme base de référence ( voir figure 14).

La teneur en acide aspartique des laines traitées diminue régulièrement et la laine qui a subi une hydrolyse de 64 heures est environ 8 fois moins riche en cet amino-acide que la laine initiale. Au contraire, la teneur en proline, après être restée constante durant les premiers temps de l'hydrolyse, augmente très nettement après 40 heures d'hydrolyse.

En conclusion, la fraction de la kératine de laine qui n'a pas été solubilisée après 64 heures d'action de l'acide sulfurique se révèle riche en cystine et en proline, et très pauvre en acide aspartique et en tyrosine.

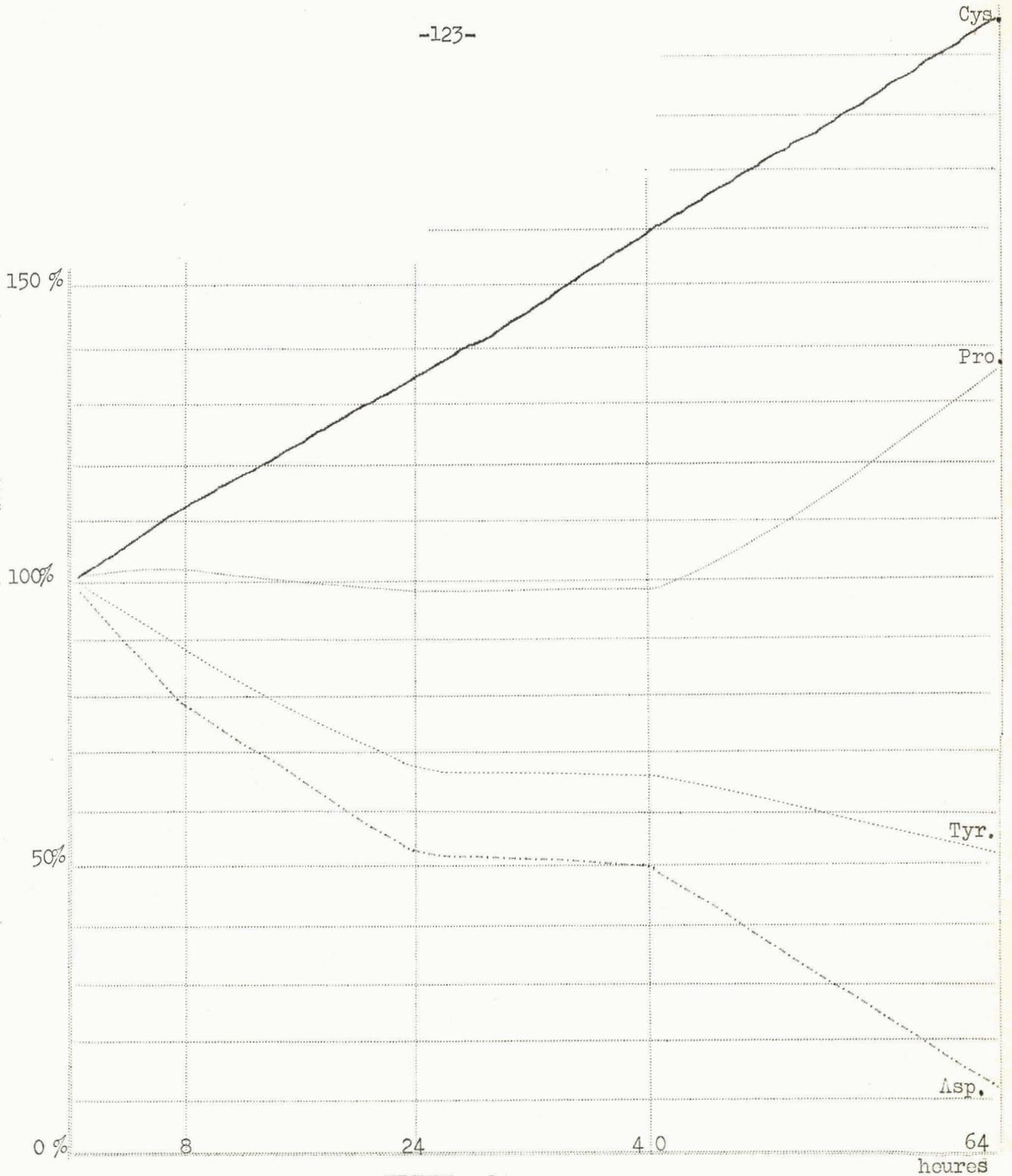


FIGURE - 14

Variation de la teneur en acide aspartique, en cystine, en proline et en tyrosine de la laine traitée par l'acide sulfurique décimormal. La laine non traitée est prise comme base de référence.



4) Aspect microscopique de la laine traitée par  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N/10.

Aux variations dans la composition en amino-acides de la laine correspondent des modifications morphologiques intéressantes. VAN OVERBEKE, MAZINGUE et DESPRETS (1954) (30) ont étudié la variation des propriétés mécaniques des fils de laine en fonction de la durée de l'hydrolyse sulfurique à l'ébullition : ils ont montré qu'après 4 heures d'hydrolyse (pH =1,8) la ténacité et l'allongement de rupture étaient déjà sérieusement diminués. De notre côté, nous avons constaté qu'après 8 heures d'hydrolyse sulfurique, les fibres avaient perdu une très grande partie de leur résistance et que celle-ci était devenue pratiquement nulle après 16 heures d'hydrolyse.

Au contraire, jusqu'à la quarantième heure de l'hydrolyse, les fibres conservent dans leur ensemble leur structure écailleuse caractéristique, bien qu'elles aient perdu 64 % de leur poids ( le tissu conserve d'ailleurs son aspect initial). Ceci indique clairement que la fraction solubilisée provient essentiellement de l'intérieur de la fibre, c'est-à-dire du cortex, et que la cuticule est nettement plus résistante à l'hydrolyse acide.

Mais après 48 heures d'hydrolyse, l'aspect des fibres se modifie profondément (+), elles se réduisent en fragments très petits ( le tissu perd toute forme et se présente à l'état humide comme une pâte). Les écailles de la cuticule disparaissent presque complètement; les dernières s'en vont au cours des deux dernières hydrolyses, tandis que de nombreux fragments d'épicuticule sont visibles et que les fibres restantes se présentent sous forme de tubes striés dans le sens de la longueur ( voir figure 15). A aucun moment il n'y a libération de cellules corticales, ce qui permet de supposer que celles-ci se solubilisent totalement au cours de l'hydrolyse ménagée.

L'aspect microscopique des tubes que nous avons obtenus est assez voisin de celui que décrit ALEXANDER (1950) (31) après l'action oxydante de l'acide peracétique sur la laine. Ces tubes peuvent être constitués par la

---

(+) Il est à remarquer d'ailleurs que la solubilisation de l'azote diminue ( voir figure 8 et tableau V) à partir de la quarantième heure d'hydrolyse.

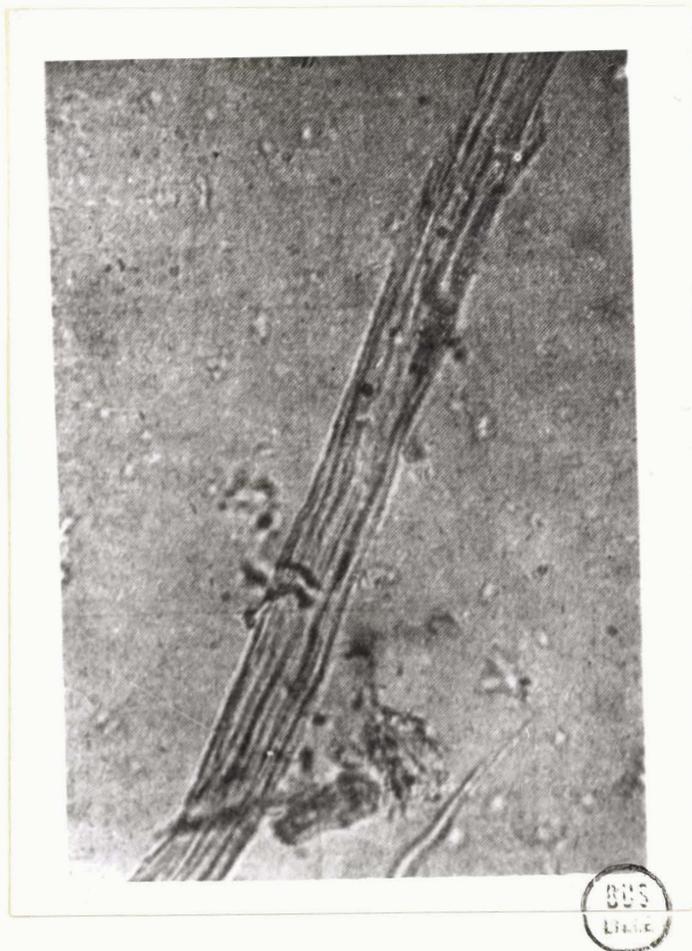


FIGURE - 15

Aspect microscopique de la laine après 64 heures d'hydrolyse par l'acide sulfurique décimormal. Remarquer l'aspect en tubes striés.

subcuticule de la fibre de laine ( ZAHN et HASELMANN . 1950 ) (32) modifiée par l'hydrolyse ménagée, ou encore par les résidus d'un certain nombre de composants histologiques de la fibre : les membranes des cellules corticales, et les fibrilles résistantes dérivées du cortex ( FRASER et ROGERS 1955 )(33) ( voir lère partie : structure morphologique ).

Il existe cependant deux différences importantes entre le résidu en forme de " tubes striés " que nous isolons et la subcuticule d' ALEXANDER. Pour cet auteur, la subcuticule ( ou  $\beta$ -kératose ), qui représente 8 à 10 % du poids de la fibre, correspond à la fraction insoluble dans l'ammoniaque diluée, après oxydation complète de la laine par l'acide peracétique. Or, si nous oxydons par l'acide performique les " tubes " obtenus après 64 heures d'hydrolyse acide ménagée, nous constatons que le dérivé d'oxydation se solubilise déjà en quelques minutes dans l'acide performique lui-même. Par ailleurs la subcuticule d' ALEXANDER ( 34 ) est pauvre en soufre ( 2,2 % ) alors que notre résidu en forme de tubes est riche en soufre ( 6,2 % ).

Il nous est donc difficile de nous prononcer sur l'identité de la membrane d' ALEXANDER avec nos " tubes striés ", qui sont obtenus par des méthodes très différentes. Il est vraisemblable que l'aspect, en forme de tubes, de ce résidu protéinique, obtenu par une hydrolyse de 64 heures, n'est qu'un " artefact " qui ne correspond plus à aucun constituant morphologique de la fibre primitive.

##### 5) Composition en amino-acides des " polypeptides thermosolubles ".

Au cours du refroidissement des hydrolysats sulfuriques, il est possible d'isoler un précipité abondant que nous avons appelé " polypeptides thermosolubles de la laine ". En refroidissant l'hydrolysat à 0°C et en le neutralisant, on augmente nettement l'importance du précipité. D'ailleurs, à partir du sixième hydrolysat de 8 heures, il est indispensable de neutraliser pour observer cette précipitation. Sur le plan expérimental, nous avons réalisé la neutralisation par dialyse contre l'eau courante à basse température : cette technique a en outre l'avantage d'éliminer les amino-acides et les polypeptides dialysables libérés au cours de l'hydrolyse. Nous avons estimé,

pour le premier hydrolysats de 8 heures, que 30 % seulement de l'azote sont dialysables : les produits de l'hydrolyse sont donc essentiellement formés de gros polypeptides adialysables; au contraire 50 % du soufre (thiol + disulfure) sont dialysables, la cystine se retrouvant donc essentiellement sous forme de petits peptides.

L'importance quantitative du précipité varie avec les temps d'hydrolyse : faible au début, elle augmente progressivement dans les cinq premiers hydrolysats de 8 heures, pour diminuer de nouveau dans les trois derniers (la quantité obtenue représente de 5 à 20 % de la fraction solubilisée).

Les "polypeptides thermosolubles de laine " se comportent comme un composé ou plutôt comme un ensemble de composés de poids moléculaire relativement élevé, non dialysables, très peu solubles dans l'eau bouillante, solubles à froid dans la soude  $N/10$  et dans l'acide formique  $0,66 M$ , et solubles à partir de  $55^{\circ} C$  dans  $SO_4H_2 N/10$ . En chromatographie de partage sur papier dans le phénol ( $NH_3$  3 %), ils donnent une seule tache de  $R_f = 1$ ; ils se révèlent également homogènes à l'électrophorèse en milieu acide formique  $0,66 M$ . Afin de nous rendre compte de leur complexité, nous avons essayé de déterminer qualitativement leurs groupements  $\alpha$ -aminés terminaux libres. Pour cela, nous avons dinitrophénylé un échantillon suivant la technique de BLACKBURN (1950) (35) et après hydrolyse totale de ce dernier, nous avons identifié par chromatographie de partage sur papier suivant la technique de BISERTE et OSTEUX (1951) (36), l'acide DNP-aspartique, la DNP-sérine, le DNP-glycocolle et la DNP-alanine. D'autres DNP-amino-acides, que nous n'avons pas identifiés sont présents, mais nous n'avons pas jugé utile de poursuivre plus avant cette investigation : il nous suffisait d'avoir une preuve de l'hétérogénéité du produit initial. Il est cependant intéressant de remarquer que les mêmes amino-acides N-terminaux ont été identifiés dans la laine (MIDDLEBROOK ) (37).

Quel que soit l'hydrolysats dont ils proviennent, ces " polypeptides thermosolubles " ont une teneur constante en azote (15,4 %); au contraire, leur composition en amino-acides varie avec le temps d'hydrolyse. Leurs teneurs en soufre (thiol + disulfure) et en tyrosine sont indiquées dans les tableaux VI et IX.

Le groupe de dérivés polypeptidiques qui apparaissent aux premiers stades de l'hydrolyse est pauvre en cystine (3 fois moins riche que la laine) et riche en tyrosine (2 fois plus que la laine) (+). Mais cette formule initiale se modifie progressivement avec le temps d'hydrolyse : Les "polypeptides thermosolubles" s'enrichissent en soufre, tout en restant toujours moins riches que la laine restante, et s'appauvrissent en tyrosine, tout en restant plus riches que la laine restante ( voir figure 16).

Dans l'étude cinétique de cette variation de la composition en soufre et en tyrosine de ce groupe de polypeptides, il est difficile de mettre en évidence des stades particuliers d'hydrolyse. Toutefois, après la quarantième heure, il est intéressant de noter que l'azote solubilisé diminue, que la quantité de polypeptides thermosolubles isolés diminue aussi et que les caractères physico-chimiques de ces composés se modifient légèrement (insolubilité exclusivement en milieu neutre, thermosolubilité moins nette, teneur en soufre plus rapidement croissante). Il est curieux de constater que la solubilité augmente alors que le nombre de ponts disulfure s'accroît : ceci semble indiquer que la richesse en cystine n'est pas le seul facteur qui gouverne l'insolubilité de la kératine de laine; on peut rappeler également que l'insuline, bien que riche en cystine, est une protéine soluble. L'étude chromatographique des hydrolysats totaux de polypeptides thermosolubles isolés après 8 heures et 64 heures d'hydrolyse révèle d'autres modifications intéressantes de leur composition en amino-acides.

La teneur en tyrosine, en phénylalanine, en sérine, en glyco-colle et acide glutamique diminue; au contraire, le taux de cystine, d'alanine et de proline augmente des premiers aux derniers échantillons de " polypeptides thermosolubles " (voir fig. 17 & 18). Cependant, les variations les plus caractéristiques concernent l'acide aspartique, qui finit par disparaître presque complètement des hydrolysats totaux.

---

(+) Nous avons isolé des " polypeptides thermosolubles " qui se forment dans la première heure de l'hydrolyse sulfurique de la laine : ils contiennent 0,36 % de soufre ( soit 10 fois moins que la laine ) et 15 % de tyrosine ( soit 3 fois plus que la laine ).

TABLEAU - IX

Teneur en tyrosine de la laine soumise à l'hydrolyse ménagée,  
et des " Polypeptides thermosolubles " formés.

Temps d'hydrolyse (en heures)	Tyrosine dans la laine traitée en %	Tyrosine des " polypep- tides thermosolubles " en %
0	5,57	
1 x 8	4,92	11,3
2 x 8	3,73	10
3 x 8	-	7,3
4 x 8	-	6,3
5 x 8	3,73	5,5
6 x 8	3,2	4,5
7 x 8	-	4
8 x 8	2,95	3

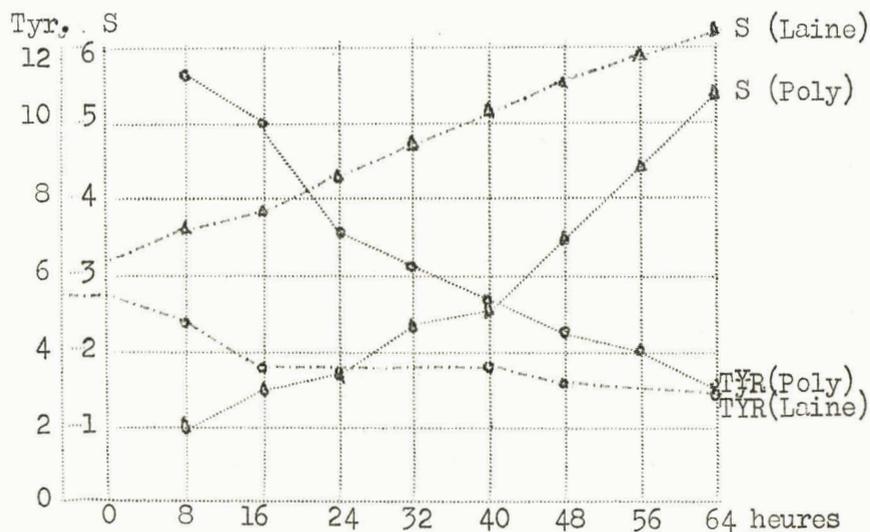


FIGURE - 16

Teneur en soufre (thiol + disulfure) et en tyrosine de la laine traitée et des "polypeptides thermosolubles " recueillis.



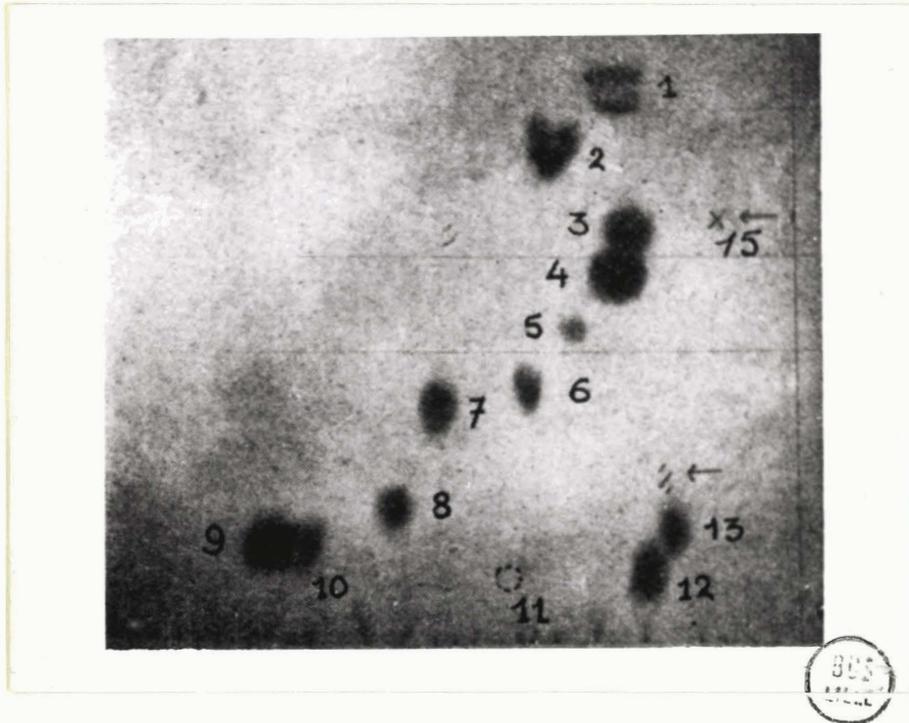


FIGURE - 17

Chromatogramme de l'hydrolysat total des " polypeptides thermosolubles " recueillis après huit heures d'hydrolyse par l'acide sulfurique décinormal. La numérotation des acides aminés est identique à celle de la figure 11.

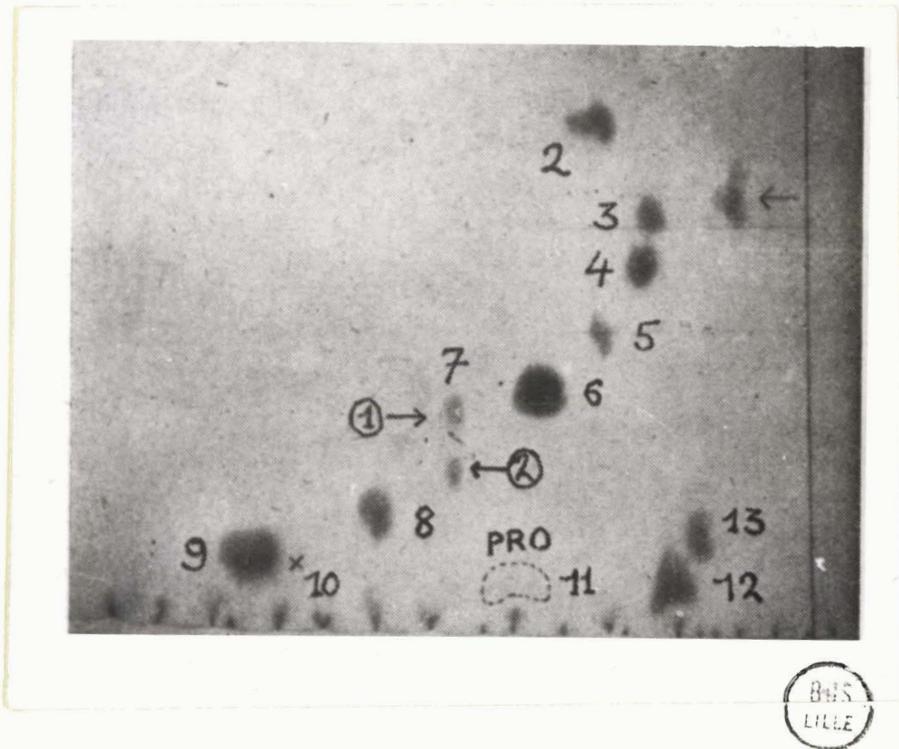


FIGURE - 18

Chromatogramme de l'hydrolysate total des " polypeptides thermosolubles " recueillis après soixante-quatre heures d'hydrolyse par l'acide sulfurique décimormal. Le spot 7 (1) correspond à la tyrosine, le spot 7 (2) peut-être à un dérivé d'oxydation de la tyrosine. La numérotation des acides aminés est identique à celle de la figure 11.

### C) Conclusion.

L'ensemble de l'expérimentation que nous avons effectuée peut se résumer de la façon suivante :

L'hydrolyse ménagée par l'acide sulfurique N/10 solubilise une certaine quantité d'azote progressivement croissante en fonction du temps : en 64 heures il est possible de solubiliser 84 % de la laine. A ce stade, la "laine" restante présente un aspect assez caractéristique en tubes striés, qu'il est difficile d'identifier avec les constituants morphologiques de la fibre primitive, et qui pourrait n'être qu'un artefact.

La fraction solubilisée au cours de l'hydrolyse ménagée est composée de deux fractions bien distinctes : l'une qui comprend essentiellement des acides aminés libres et des petits polypeptides, l'autre qui est constituée par un groupe de " polypeptides " non dialysables, présentant un caractère physico-chimique commun, qui est leur thermosolubilité en milieu sulfurique dilué.

La composition de la "fraction amino-acide" reste sensiblement identique pendant toute la durée de l'hydrolyse partielle, sauf aux derniers stades. Elle est très riche en acide aspartique, riche en sérine et en glyco-colle. On conçoit parfaitement que, pour des temps prolongés d'hydrolyse, les produits finals obtenus ( laine restante en tubes et polypeptides thermosolubles) soient presque dépourvus d'acide aspartique et très appauvris en sérine et en glyco-colle ( voir figures 13 & 18 ). Ces résultats rappellent ceux de PARTRIDGE et DAVIS (1950) (38), qui obtiennent par hydrolyse partielle de protéines ( insuline, gélatine, etc.) par des acides organiques, trois fractions principales :

- a) des fragments protéiques de dimensions "colloïdales",
- b) des polypeptides de haut poids moléculaire,
- c) de l'acide aspartique avec de petites quantités d'autres amino-acides.

Il est important de faire remarquer qu'après l'acide aspartique, ce sont les autres acides aminés neutres à chaîne courte (glyco-colle, sérine et à un degré moindre, alanine) qui sont le plus facilement détachés : ACHER, JUTISZ et FROMAGEOT (1950) (39) ont également signalé la libération préférentielle

de ces amino-acides au cours de l'hydrolyse ménagée du lysozyme.

La composition des "polypeptides thermosolubles " est progressivement variable. Cette variabilité affecte particulièrement le taux de soufre (thiol + disulfure) et de tyrosine. Les produits initiaux sont pauvres en soufre et riches en tyrosine; les produits finals, qui proviennent d'une laine traitée enrichie en soufre ( voir Tableau VI) et appauvrie en tyrosine ( voir Tableau IX) sont au contraire riches en soufre et pauvres en tyrosine.

Quant à la laine restante, elle a également une composition continuellement variable au fur et à mesure que progresse l'hydrolyse, puisqu'après 64 heures d'hydrolyse, elle a une teneur en soufre (et donc en cystine) qui a doublé, une teneur en tyrosine qui a diminué de 50 % (voir fig.16).

La caractéristique essentielle de cette hydrolyse ménagée est donc sa "nature préférentielle", puisque les fragments solubilisés ont une composition chimique nettement différente de celle de la laine dont ils proviennent.

Ceci semblerait pouvoir s'expliquer, à première vue, par la structure morphologique de la laine. On pourrait, en effet, supposer que les couches les plus externes de la fibre, -l'épicuticule, la cuticule et la subcuticule, - s'hydrolyseraient plus rapidement, puisqu'elles seraient plus facilement en contact avec le milieu d'hydrolyse; le cortex, protégé par les couches externes, et qui aurait une composition chimique différente de celles-ci, serait moins accessible à l'eau et aux ions et s'hydrolyserait donc plus lentement. Il ne semble pas que l'on puisse s'arrêter sérieusement à cette hypothèse, car le cortex représente à lui seul environ 90 % du poids de la fibre; ce ne serait donc qu'aux premières heures de l'hydrolyse qu'on pourrait observer une hydrolyse préférentielle des couches externes : or, le phénomène se poursuit durant toute l'action de l'acide sulfurique.

Au contraire, des considérations fondées sur l'hétérogénéité chimique de la fibre de laine, - et plus spécialement du cortex, - sembleraient apporter une explication satisfaisante de ce phénomène d'hydrolyse préférentielle.

Puisque le cortex est formé d'un faisceau de cellules corticales soudées entre elles par un ciment intercellulaire (voir lère partie, structure morphologique), que d'autre part il est bien établi que la laine contient au moins 7 chaînes polypeptidiques différentes ( voir plus haut) et que par

conséquent elle est vraisemblablement formée d'un mélange de protéines, on peut supposer que le ciment intercellulaire est formé de protéine pauvre en soufre et riche en tyrosine, en acide aspartique, en sérine et en glyco-colle. La richesse en acide aspartique, sérine et glyco-colle expliquerait que l'hydrolyse de ce ciment soit plus facile que celle des cellules corticales, puisque les liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés ces amino-acides sont moins solides.

Le ciment intercellulaire de la fibre s'hydrolyserait donc plus rapidement, et au fur et à mesure que l'hydrolyse progresserait, les cellules corticales seraient attaquées à leur tour; on comprendrait alors, - les deux protéines, de composition chimique différente, s'hydrolysant avec des vitesses différentes, - que l'on observe une composition continuellement variable de l'hydrolysat et de la laine restante.

Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier l'hydrolyse par l'acide sulfurique décimormal des cellules corticales de la laine.

---

CHAPITRE IV

HYDROLYSE MENAGEE DES CELLULES CORTICALES DE LA LAINE

PAR L'ACIDE SULFURIQUE DECINORMAL.

A - Préparation des cellules corticales.

Les enzymes protéolytiques : trypsine, pepsine et surtout papaïne, hydrolysent la laine en libérant les cellules corticales (voir chapitre V); celles-ci, même par une action prolongée de l'enzyme, ne sont pas attaquées.

L'examen microscopique du résidu montre qu'il est essentiellement formé par un faisceau de cellules fusiformes (voir fig.21) contenant des fragments de la cuticule (vraisemblablement l'épicuticule). On peut donc en conclure que les enzymes hydrolysent essentiellement le ciment intercellulaire du cortex.

Les cellules corticales ont été préparées de la façon suivante : 100 g de laine anhydre, dégraissée par l'éther, sont hydrolysés à 65° C, par 2 litres d'une solution contenant 8 g de papaïne commerciale (qualité Prolabo titre 80), 20 g de métabisulfite de sodium et 14 g de bicarbonate de sodium (pH de la solution 7,2). Après 6 heures d'hydrolyse, le résidu insoluble est filtré sur un entonnoir en verre fritté, lavé abondamment à l'eau distillée, et essoré. Ce résidu est hydrolysé une deuxième fois par 2 litres d'une solution de papaïne dans des conditions identiques. Le résidu de la deuxième hydrolyse papaïnique est lavé à l'eau distillée et séché. Il pèse 28 grammes. Au microscope optique, il se présente sous l'aspect d'un amas de cellules fusiformes contenant des fragments d'épicuticule.

B - Résultats expérimentaux.

Nous avons adopté une technique semblable en tous points (sauf pour la durée) à celle que nous avons utilisée pour la laine elle-même ( voir chapitre 111).

25 g de cellules (poids anhydre) sont hydrolysés, à l'ébullition sous réfrigérant à reflux, par 500 ml d'acide sulfurique N/10 pendant 16 heures. L'hydrolysate est ensuite filtré bouillant et les cellules restantes sont neutralisées, rincées et séchées. Ces cellules restantes sont de nouveau hydrolysées pendant 16 heures par 500 ml d'acide sulfurique N/10 dans des conditions expérimentales identiques aux précédentes. Nous avons ainsi effectué trois hydrolyses successives de 16 heures et une quatrième hydrolyse de 24 heures.

Comme ceux obtenus par hydrolyse de la laine, les trois premiers hydrolysats laissent déposer par refroidissement un précipité blanc gélatineux (polypeptides thermosolubles), qu'il est possible d'isoler dans les conditions indiquées plus haut (voir chapitre 111).

C - Comparaison entre l'hydrolyse sulfurique des "cellules corticales " et l'hydrolyse sulfurique de la "laine ".

Il faut d'abord souligner que la composition en amino-acides des cellules corticales (du moins en ce qui concerne la cystine et la tyrosine, seuls acides aminés que nous ayons dosés) est différente de celle de la fibre elle-même. Les cellules corticales sont en effet un peu plus riches en soufre disulfure que la laine elle-même (+) (3,65 % dans les cellules, 3,13 % dans la laine) et nettement plus pauvres en tyrosine (3,02 % dans les cellules, 5,57 % dans la laine). Ces résultats sont évidemment en faveur de l'hétérogénéité chimique de la fibre de laine.

---

(+) Ceci confirme les résultats de STAKHEYEWA-KAVERZNEWA et GAVRILLOV (1937) (40) et de SPEAKMAN et ELLIOT (1946) (41).

Cependant, malgré cette différence de composition, l'hydrolyse par l'acide sulfurique décimormal des cellules corticales est tout à fait comparable à celle de la laine elle-même.

Nous avons pu vérifier, à l'aide de la chromatographie sur papier, que la fraction "amino-acide" des hydrolysats sulfuriques des cellules corticales était également très riche en acide aspartique libre (+).

TABLEAU - X

Cinétique de la solubilisation de l'azote et du soufre au cours de l'hydrolyse par l'acide sulfurique N/10 des cellules corticales de la laine.

Cellules corticales : N total : 16,4 %; Soufre (thiol+disulfure):3,65 %.

Temps d'hydrolyse	N solubilisé en % de N initial	S (thiol+disulfure) solubilisé en % de S initial
Après la 1 <sup>o</sup> hydrolyse de 16 heures	19,5	6,14
- la 2 <sup>o</sup> -	45,8	20,6
- la 3 <sup>o</sup> -	65,1	36,5
Après 72 h. d'hydrolyse	83,2	65,6

(+) Nous avons également soumis à l'hydrolyse sulfurique décimormal, pendant 4 heures, un échantillon de fibres artificielles à base de caséine lactique formolée; bien que ces fibres soient très riches en acide glutamique et relativement pauvres en acide aspartique, la fraction "amino-acide" de l'hydrolysats contient essentiellement de l'acide aspartique libre et seulement des traces d'acide glutamique libre.

TABLEAU - XI

Teneur en soufre (thiol + disulfure) et en tyrosine des cellules corticales soumises à l'hydrolyse et des "polypeptides thermosolubles" formés.

Temps d'hydrolyse (en heures)	Soufre des cellules traitées (en %)	Soufre des "polypeptides thermosolubles" recueillis (%)	Tyrosine des cellules traitées (en %)	Tyrosine des "polypeptides thermosolubles" recueillis (%)
0	3,65		3,02	
1 x 16	3,96	1,28	2,1	5,73
2 x 16	4,4	1,76		
3 x 16	4,6	3,76		2,8

TABLEAU - XII

Hydrolyse de la "corne" par l'acide sulfurique N/10.

Corne : N total : 16,4 %; Soufre (thiol + disulfure) : 3,44 %.

Temps d'hydrolyse (en heures)	N solubilisé en % de N initial	S solubilisé en % de S initial	Teneur en soufre de la corne après hydrolyse
0			3,44
16	37,5	15,4	4,21
32	67,8	35,1	5,17



La comparaison du tableau X (hydrolyse des cellules corticales) et du tableau V (hydrolyse de la laine) montre que la cinétique de la libération de l'azote et du soufre est pratiquement identique pour les deux substrats. La fraction solubilisée est nettement moins riche en soufre que la protéine dont elle provient. L'examen du tableau XI montre également que les cellules s'enrichissent en soufre et s'appauvrissent en tyrosine au fur et à mesure que progresse l'hydrolyse; de même, les "polypeptides thermosolubles" formés sont d'autant plus riches en soufre et plus pauvres en tyrosine qu'on les recueille à des stades plus avancés de l'hydrolyse.

Enfin, nous avons vérifié que l'hydrolyse de la corne par l'acide sulfurique décinormal est également comparable à celle de la laine ou des cellules corticales (voir tableau XII). Il se dépose par refroidissement des hydrolysats des "polypeptides thermosolubles".

D - Conclusions.

Les cellules corticales représentent une portion de la fibre nettement individualisée du point de vue morphologique. Elle se distinguent également du reste de la fibre du point de vue chimique, puisqu'elles sont inattaquables par la papaïne, alors que les autres constituants protéiniques (72 % du poids de la fibre) sont facilement hydrolysés par cet enzyme; par ailleurs, elles sont un peu plus riches en soufre et nettement plus pauvres en tyrosine que la fibre dans son ensemble.

Malgré ces différences, à la fois d'ordre morphologique et chimique, les résultats de l'hydrolyse sulfurique ménagée des cellules corticales sont en tous points comparables à ceux obtenus avec la laine. Aussi, ceci nous amène à conclure que la kératine des cellules doit avoir une structure chimique très voisine de celle des autres constituants de la fibre; les différences de composition en acides-aminés des différentes kératines sont vraisemblablement de peu d'importance en ce qui concerne leur structure fondamentale : nos expériences d'hydrolyse sulfurique sur la "come" ne font que confirmer cette hypothèse.

Par ailleurs, l'acide sulfurique décinormal à 100°C se révèle comme un agent spécifique d'hydrolyse des kératines, puisqu'il libère d'une façon très sélective l'acide aspartique. L'énucléation progressive de cet amino-acide permet la libération de tronçons de chaînes, dont les "polypeptides thermosolubles" que nous avons décrits constituent certainement une fraction intéressante, et il reste finalement un résidu riche en cystine, en proline, et ne contenant presque plus d'acide aspartique.

Arrivés à ce stade de notre travail, il nous a semblé intéressant de pouvoir comparer cette hydrolyse par un agent chimique, qui s'est révélé comme ayant une action nettement préférentielle sur les liaisons peptidiques des kératines de la laine, avec l'hydrolyse par des enzymes dont la spécificité d'action est bien connue.

---

CHAPITRE V

HYDROLYSE DE LA LAINE PAR LA PEPSINE CRISTALLISEE.

L'une des caractéristiques des kératines est leur résistance assez marquée à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques. Aussi les conditions utilisées par différents auteurs, dans l'hydrolyse enzymatique de la laine, ne sont pas celles qui sont habituellement employées dans l'hydrolyse des protéines solubles. La plupart des expérimentateurs mettent en oeuvre de fortes concentrations de l'enzyme par rapport au substrat, des temps d'action prolongés, et modifient plus ou moins la laine par des réactifs chimiques pour la rendre plus susceptible à l'action de l'enzyme.

MEUNIER, CHAMBARD et COMTE (1927) (42), FROMAGEOT et PORCHARD (1931) (43), par action prolongée de la pancréatine sur la laine qui a été partiellement dégradée par les alcalis, ont désintégré la fibre en ses composants morphologiques : cuticule et cellules corticales; seul le ciment intercellulaire est hydrolysé. STAKHEYEWA-KAVERZNEWA et GAVRILOW (1937) (44) utilisant la même technique, ont montré que les cellules corticales sont absolument résistantes à l'attaque par la pancréatine; ils ont indiqué également que la kératine des cellules est plus riche en soufre et en arginine que celle du ciment intercellulaire; ils en déduisent que les qualités spécifiques des kératines et la structure cristalline n'appartiennent qu'aux kératines des cellules.

ELOD et ZAHN (1946) (45) ont étudié également l'action de la pancréatine sur la laine : ce complexe enzymatique n'hydrolyse pas plus de 10 % environ d'une laine qui n'a subi aucun traitement préalable; si la laine a été, au préalable, réduite par l'acide thioglycolique de manière à ce que 50 % des liaisons disulfures soient rompues, l'enzyme est alors capable d'hydrolyser 22 % de cette laine partiellement réduite; l'hydrolyse atteint 80 % et plus si la laine a subi un prétraitement dans ClH 0,1 N pendant 23 heures à 100° C, ou si elle a été traitée dans un solvant qui coupe les liaisons hydrogène (formamide à 122° C pendant 3 heures). L'analyse aux rayons X

montre que le prétraitement à l'acide chlorhydrique ou à la formamide transforme l' $\alpha$ -kératine en  $\beta$ -kératine désorientée, ce qui amène ELÖD et ZAHN à conclure que la susceptibilité à l'attaque enzymatique ne dépend pas de la rupture des liaisons disulfures, mais bien de la configuration moléculaire (+).

GEIGER, PATTERSON, MIZELL et HARRIS (1941) (46) ont cependant montré que la fibre ne pouvait être désintégrée en cellules corticales par la pepsine, qu'après réduction partielle des liaisons disulfures par le thioglycolate alcalin. LENNOX (1952) (47) a signalé qu'une solution de pepsine à 1 % (pH 1,8) contenant du bisulfite de sodium pouvait dissoudre 48 % de la laine.

Parmi les différents enzymes protéolytiques, c'est incontestablement la papaïne qui hydrolyse le plus facilement la laine.

SCHÖBERL et HAMM (1948) (48) ont montré qu'une solution de papaïne à 4 grammes par litre, activée par du cyanure de potassium (pH 9), peut dissoudre 52 % de la laine, et que par des changements répétés de la solution papaïnique, 80 % peuvent se dissoudre; il reste finalement une masse fibrillaire inattaquable par l'enzyme.

BLACKBURN (1950) (49) traite la laine durant 3 h 30 min. par 2 % de papaïne en solution dans du bisulfite de sodium à 1 % (pH 6,7); dans ces conditions 27 % de la laine se solubilisent (57 % pour 24 heures d'action). L'hydrolysât papaïnique, amené à pH 4 par de l'acide acétique, donne un précipité volumineux représentant 10 à 20 % de la "protéine" solubilisée; ce polypeptide est nettement plus pauvre en soufre que la laine dont il provient. Les peptides qui restent solubles après acidification à pH 4 sont en moyenne des pentapeptides.

LENNOX (1952) (50) a montré que la solubilisation de la laine par une solution de papaïne-bisulfite (pH 7) est complète en quelques heures à 70° C, si l'on ajoute une assez forte proportion d'urée à la solution (solution d'urée 4 M). Ceci indique de façon très nette que toutes les protéines de la laine, même celle des cellules corticales, peuvent être hydrolysées

---

(+) Nos propres résultats sur l'hydrolyse pepsique de la laine ne semblent pas pouvoir confirmer cette conclusion (voir plus loin).

par les enzymes si l'on coupe à la fois les liaisons disulfures et les liaisons hydrogène qui pontent entre elles les différentes chaînes polypeptidiques.

La modification de la surface écailleuse des fibres, par des solutions de bisulfite contenant de la papaïne, pour obtenir des laines "irrétrécissables", a fait l'objet de plusieurs brevets.

Enfin, il est intéressant de signaler que LINDERSTRÖM -LANG et DUSPIVA (1935) (51) ont montré que l'intestin des larves de mites contient une substance capable de réduire les liaisons disulfures de la kératine, ce qui la rend ensuite hydrolysable par les enzymes protéolytiques présents dans la sécrétion intestinale.

#### A - Hydrolyse pepsique de la laine intacte.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes proposé d'étudier l'action de la pepsine sur la laine qui n'a subi aucune modification chimique.

Nous avons traité de la laine "Mérinos 100-105 " (sous forme de ruban peigné) par 50 fois son poids d'acide sulfurique décinormal contenant 0,02 g % de pepsine cristallisée : dans ces essais le rapport enzyme/substrat insoluble est donc de 1 % (+). Les hydrolyses sont réalisées à l'étuve à 37° C avec agitation manuelle plusieurs fois par jour. On effectue à des intervalles de temps réguliers des prélèvements sur lesquels on dose l'azote total par la méthode classique de Kjeldahl. La cinétique de libération de l'azote est résumée dans le tableau Xlll.

Au bout de 7 jours, 11 % de l'azote total de la laine sont donc dissous. La progression de l'hydrolyse se ralentit ensuite, comme le montrent nettement le tableau Xlll et la figure 19 : en effet, après 14 jours, 12 % seulement, et après 22 jours, 12,3 % de l'azote total sont solubilisés : il semble donc que le chiffre de 11 % représente un palier au cours de l'hydrolyse pepsique d'une laine intacte (++).

---

(+) Ce rapport est celui habituellement utilisé dans l'hydrolyse enzymatique des protéines solubles. LENNOX (1952) (52) utilise un rapport enzyme/laine égal à 30 %.

(++) Il est intéressant de rappeler que ÉLOD et ZAHN (1946) (53) trouvent également que la pancréatine ne dissout en 3 jours, que 8 % d'une laine qui n'a subi aucun traitement préalable.

Au cours de l'hydrolyse pepsique, la laine subit des modifications morphologiques importantes : après 16 jours, on constate une perte importante de la résistance mécanique et, à l'examen microscopique, on peut observer que par endroit les fibres sont fortement " altérées " et que les cellules corticales commencent à être libérées ( voir figure 20). Il est donc vraisemblable que la pepsine attaque principalement une partie du ciment intercellulaire et certaines couches de la cuticule, mais l'attaque n'est pas aussi avancée en tous les points de la fibre.

Cette solubilisation est bien de nature enzymatique. En effet, l'acidité du milieu ( $\text{SO}_4\text{H}_2$   $\underline{\text{N}}/10$ ) ne provoque, en 14 jours, qu'une dissolution de 1,6 % de l'azote (voir tableau XIII). Il s'agit d'ailleurs surtout d'une libération d'ammoniaque à partir des fonctions amides de l'asparagine et de la glutamine. Cette hydrolyse progresse très lentement en fonction du temps : elle atteint par exemple 3,2 % en 43 jours. On peut d'ailleurs en déduire que la très légère augmentation que l'on observe entre le 7<sup>o</sup> et le 21<sup>o</sup> jour d'hydrolyse pepsique résulte uniquement de l'hydrolyse acide partielle et n'est pas de nature enzymatique. Cette hydrolyse acide ne libère pas les cellules corticales; la laine conserve son aspect initial.

On pouvait, d'autre part, se demander si l'arrêt de l'hydrolyse n'était pas provoqué par une inhibition de la pepsine par les polypeptides libérés. Or, il n'en est rien : car, en renouvelant le milieu d'hydrolyse tous les 7 jours, -opération facilitée par l'insolubilité du substrat, que l'on peut aisément isoler et laver, -on constate que le degré d'hydrolyse ne s'élève guère. Quand on renouvelle 3 fois le milieu, la solubilisation atteint seulement 15 %.

On peut donc conclure que l'hydrolyse pepsique d'une laine intacte permet la solubilisation de 10 à 12 % environ de l'azote total.

En même temps que la libération de l'azote, nous avons également étudié la libération du soufre (thiol + disulfure) et de la tyrosine. Après 22 jours d'hydrolyse, on ne trouve en solution que 3,2 % du soufre (thiol + disulfure) initial. Par contre, pour le même temps d'action, 13,3 % de la tyrosine totale sont solubilisés. Les fractions solubilisées sont donc pauvres en soufre et relativement riches en tyrosine. (+).

---

(+) Le soufre (thiol+disulfure) et la tyrosine apportés par la pepsine ont été déduits.

TABEAU -X111

Cinétique de la solubilisation de l'azote, du soufre (thiol + disulfure) et de la tyrosine au cours de l'hydrolyse pepsique de la laine (température 37°C).

Laine : N total : 16,55 %.

Soufre (thiol + disulfure) : 3,13 %; Tyrosine 5,57 %.

Temps	N solubilisé en % de N total		S (thiol+disulfure) solubilisé en % du soufre initial	Tyrosine solubilisée en % de la tyrosine totale
	Hydrolyse pepsique	Hydrolyse sulfurique N/10 à 37° C		
7 jours	11	0,75	3	12,2
	10,25			
14 jours	12	1,57	3,2	13,3
	10,43			
22 jours	12,3	-	3,2	13,3
43 jours		3,2		

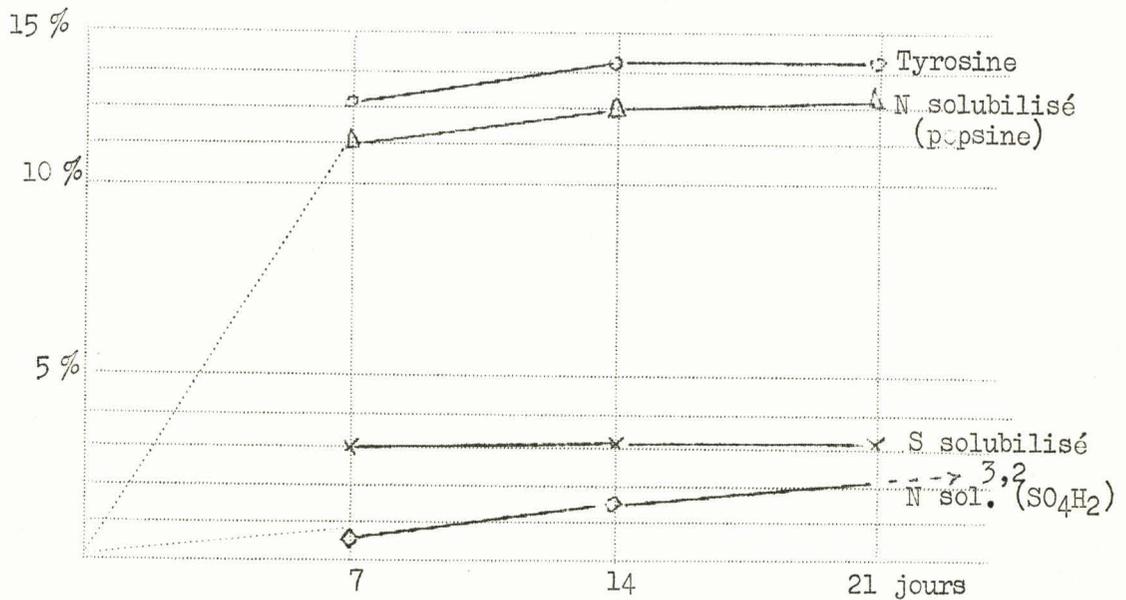


FIGURE - 19

Cinétique de l'hydrolyse pepsique d'une laine intacte.





FIGURE - 20

Microphotographie d'une fibre de laine après une hydrolyse pepsique d'une durée de 16 jours.

Nous avons d'autre part essayé de préciser la nature de quelques polypeptides libérés au cours de l'hydrolyse pepsique. Il est d'abord important de souligner que l'hydrolysats ne donne aucun précipité par addition d'acide trichloracétique, ce qui indique qu'il ne contient pas de gros polypeptides : ceci constitue une différence très nette d'avec les hydrolysats sulfuriques et les hydrolysats papaïnique. Le fractionnement a été réalisé suivant la technique de BISERTE (1952) (54); il comporte successivement des chromatographies sur résines à échange d'ions et des chromatographies de partage sur colonne de poudre de cellulose avec le mélange butanol/acide acétique comme système solvant.

Après la chromatographie sur poudre de cellulose, on obtient 8 sous-fractions. Nous n'insisterons que sur la composition d'une seule d'entre elles, qui nous paraît assez caractéristique. Après hydrolyse totale, elle apparaît en effet particulièrement riche en leucine et en phénylalanine. En chromatographie unidimensionnelle sur papier dans le système butanol/acide acétique et après révélation à la ninhydrine, elle se montre principalement composée de 2 taches, l'une violette, l'autre bleutée, un peu moins rapide, qui rappelle par sa coloration la tache de phénylalanine. Les comportements chromatographiques de ces peptides s'apparentent étroitement à ceux de la leucine et de la phénylalanine.

On peut séparer ces deux composés sur une colonne de charbon, suivant la technique de FROMAGEOT (1948) (55), complétée par une ultime purification à l'aide d'une chromatographie unidimensionnelle séparative sur papier dans le système butanol/acide acétique. Après hydrolyse totale, la tache "bleutée" contient les acides aminés suivants, dont les proportions relatives ont été estimées selon la règle de DENT (1948) (56): acide glutamique :10; glycolle :10; alanine :10; valine :3 ; diaminés : 3 ; phénylalanine : 20 ; leucine : 20 . La tache "violette" comprend les constituants suivants : acide glutamique : 5 ; glycolle : 5 ; alanine : 2; diaminés : 2 : leucine:10 pas de phénylalanine. La prédominance de la leucine et de la phénylalanine dans ces peptides est donc évidente.

On peut, certes, expliquer ces constatations par la coexistence possible de ces peptides et de leucine et de phénylalanine libres, surtout de phénylalanine, seul amino-acide que DESNUELLE (1952) (57) ait pu trouver

à l'état libre dans les hydrolysats pepsiques. Dans ces conditions, il faudrait admettre une identité absolue de comportement des peptides considérés et des amino-acides libres, à la fois au cours de la chromatographie de partage sur colonne de cellulose ou sur papier et au cours de la chromatographie de partage sur colonne de charbon. Cette éventualité est très peu vraisemblable. Nous avons donc affaire, très probablement, à deux peptides caractéristiques et il est très curieux de noter que l'on retrouve des peptides possédant une structure voisine dans des hydrolysats pepsiques de protéines très différentes, comme la cristalbumine, les sérum-globulines, etc. Cette constatation est naturellement en faveur d'une certaine spécificité d'action de la pepsine.

#### B - Hydrolyse pepsique de laines modifiées par des réactifs chimiques.

Cette première série d'expériences montre donc que l'hydrolyse de la laine par la pepsine, dans les conditions habituellement utilisées pour les protéines solubles, est très lente et que seule une petite fraction (11 %) de la fibre se solubilise. Cette fraction soluble a cependant une caractéristique très importante : sa pauvreté en soufre.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons essayé de mettre en évidence l'influence que pouvaient avoir des modifications chimiques de la laine, - et spécialement la rupture de ses liaisons disulfures, - sur son comportement vis-à-vis de la pepsine.

##### 1) Hydrolyse pepsique de la laine "réduite".

Les hydrolyses pepsiques sont conduites comme précédemment ( 37° C, rapport enzyme/substrat : 1 %), à cette différence près que le milieu d'hydrolyse contient du bisulfite de sodium à une concentration sensiblement M/10 (pH = 1,8).

PHILLIPS (1946) (58) a montré que le bisulfite de sodium coupait une partie des liaisons disulfures de la laine en donnant des groupements thiols

et S-cystéine-sulfonate de sodium ( voir lère partie, chapitre 11).

Nous avons suivi la libération de l'azote et du soufre (thiol + disulfure), que nous avons résumée dans le tableau XIV.

TABLEAU - XIV

Cinétique de la solubilisation de l'azote et du soufre (thiol + disulfure)  
au cours de l'hydrolyse pepsique en présence du bisulfite de sodium  
( température 37 ° C).

Temps	N solubilisé en % de N total	S ( thiol + disulfure) solubilisé en % de S total
1 jour	14,4	10,3
2 jours	27,3	25,4
3 jours	38,8	-
5 jours 1/2	58,3	54
10 jours	68,4	72
Rénouvellement du milieu d'hydrolyse + 16 jours	76	

Il est frappant de constater que, dans ces conditions, l'attaque de la laine est très importante : elle atteint, en effet, 68 % de l'azote total en 10 jours. En renouvelant le milieu d'hydrolyse (pepsine, bisulfite de sodium et acide sulfurique) et en prolongeant le contact encore 16 jours à 37° C, la solubilisation se poursuit et l'on arrive à 76 % de l'azote total. Le résidu inattaqué est constitué par les cellules corticales de la fibre et des fragments de la cuticule. La fraction solubilisée est donc essentiellement constituée par le ciment intercellulaire (voir figure 21).

Il est intéressant de faire également remarquer que le bisulfite n'inhibe pas l'activité enzymatique de la pepsine, bien que ce réducteur coupe vraisemblablement certains ponts disulfures de l'enzyme. KERN et HERRIOT (1953) (59) ont d'ailleurs signalé que la pepsine conservait toute

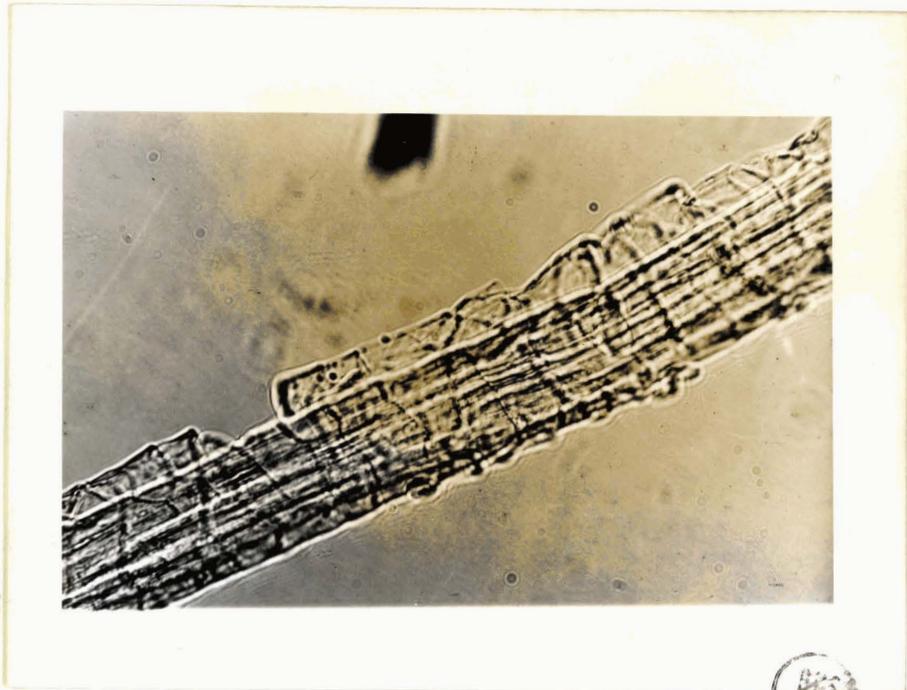


FIGURE - 21

Microphotographie d'une fibre de laine après hydrolyse pepsique en milieu bisulfite de sodium (durée 10 jours).

son activité quand un de ses ponts disulfures était rompu. La rupture des deux autres ponts provoque au contraire l'inactivation.

L'étude électrophorétique sur papier, en tampon véronal de pH 8,6, des peptides libérés à différents temps d'hydrolyse, révèle la présence de plusieurs fractions distinctes (voir figure 22). On distingue notamment une fraction lente très homogène (zone 1) et une fraction plus complexe, hétérogène, qui représente un ensemble de nombreux types de peptides.

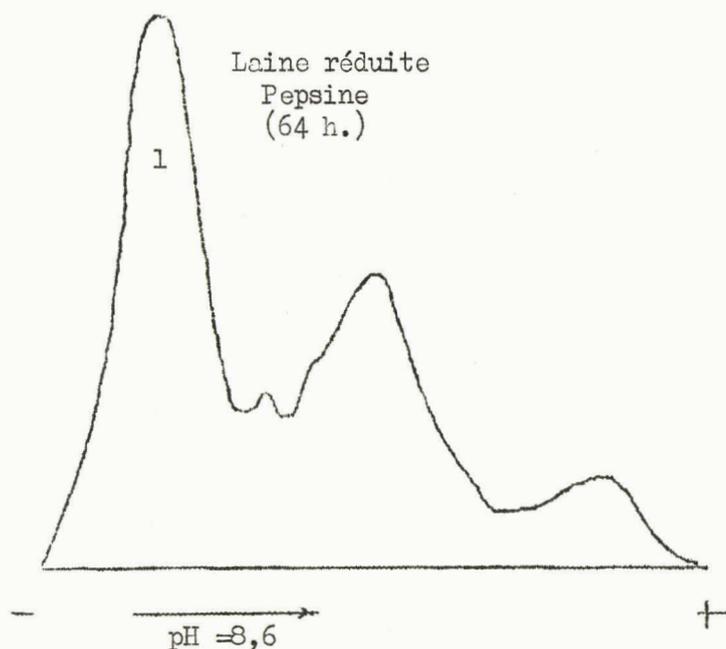


FIGURE - 22

Electrophorègramme d'un hydrolysât pepsique de laine.

Alors que, dans l'hydrolyse pepsique en l'absence de réducteur, la petite fraction solubilisée (11 %) est pauvre en soufre (thiol + disulfure), il est frappant de constater qu'en présence de bisulfite il y a un parallélisme constant entre les cinétiques de solubilisation de l'azote et du soufre (tableau XIV). Les fractions solubilisées ont sensiblement la même teneur en soufre que la laine initiale.

2 ) Hydrolyse pepsique de la laine "oxydée ".

Si la réduction des liaisons disulfures de la laine permet à la pepsine d'hydrolyser 76 % de la fibre, on pouvait prévoir que l'oxydation de ces mêmes liaisons devait avoir un effet du même ordre.

Nous avons oxydé la laine par la technique d'ALEXANDER (1950) (60): 2 grammes de laine sont plongés pendant 24 heures, à la température du laboratoire, dans 50 ml d'une solution d'acide peracétique à 2 %; la laine est ensuite lavée abondamment à l'eau distillée; il ne se produit aucune dissolution des fibres au cours du traitement. Nous avons vérifié que cette laine oxydée ne contenait plus de soufre (thiol + disulfure). La laine oxydée est hydrolysée par la pepsine dans des conditions identiques à celles utilisées pour la laine intacte ( en l'absence de bisulfite).

Le tableau XV résume la progression de l'hydrolyse en fonction du temps. La comparaison des tableaux XLV et XV montre que l'hydrolyse par la pepsine d'une "laine oxydée " est beaucoup plus rapide que celle d'une "laine réduite " (+). Par ailleurs, on n'observe à aucun moment une libération de cellules corticales, comme avec la laine intacte ou avec la "laine réduite ", et on obtient finalement un résidu inattaquable par l'enzyme qui a l'aspect de la "subcuticule " d'ALEXANDER.

TABLEAU - XV

( voir page suivante )

---

(+) L'hydrolyse, par l'acide sulfurique décimormal à 100 ° C, d'une laine "oxydée " est également beaucoup plus rapide que celle d'une laine non traitée. En 5 heures 45 % de l'azote total de la laine oxydée sont passés en solution, tandis que dans les mêmes conditions, 6 % seulement sont solubilisés à partir d'une laine non traitée ( tableau V). On constate toujours la libération préférentielle d'acide aspartique et l'apparition de "polypeptides thermosolubles ".

TABLEAU - XV

Cinétique de la solubilisation de la "laine oxydée" au cours de l'hydrolyse pepsique. (+)

Temps	Laine solubilisée en % (++)
2 jours	61,5
3 jours	73,1
5 jours	85,4
10 jours	91,7
25 jours	91,7

(+) La solubilisation de la laine oxydée par  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N/10 à 37° C en l'absence de pepsine est négligeable (2,6 % en 3 jours).

(++) Déterminée par pesée du résidu insoluble dans le milieu d'hydrolyse.

3) Hydrolyse pepsique de la DNP-laine.

SANGER (1945) (61) a montré que le 2-4 dinitrofluorobenzène réagit sur les groupements aminés libres des protéines, sur les hydroxyles tyrosiniques et sur le noyau de l'histidine.

La technique de dinitrophénylation que nous avons adoptée est la suivante: on traite 10 g de laine anhydre en présence de 200 ml d'eau et 400 ml d'alcool dans lesquels on dissout 10 g de bicarbonate de sodium et 5 g de 2-4 dinitrofluorobenzène; on porte à l'étuve à 40 ° C pendant 24 heures. La laine est alors extraite à l'appareil de Soxhlet par de l'alcool, jusqu'à ce que ce dernier reste incolore (l'opération dure 30 heures); on procède ensuite à une extraction à l'éther pendant plusieurs heures et finalement on rince la laine dans une solution d'acide acétique à 1 %, puis dans l'eau. Le traitement de dinitrophénylation produit une augmentation de poids de 10,2 %.

Cette augmentation de poids correspond à celle que l'on peut attendre de la dinitrophénylation des amino-acides N-terminaux et de celle de la lysine, de l'histidine et de la tyrosine (+).

La DNP-laine n'est pas attaquée par la pepsine (pH 1,8) même en présence de bisulfite; au contraire, la DNP-laine soumise à l'oxydation par l'acide peracétique est devenue hydrolysable par la pepsine, mais l'hydrolyse est lente : 40 % de la DNP-laine oxydée se solubilisent en 7 jours sous l'action de la pepsine; il n'y a pas libération de cellules corticales.

---

(+) Si l'on ne procède pas à une extraction soignée, à l'alcool et à l'éther, de la laine dinitrophénylée, l'augmentation de poids est nettement plus importante, car la laine adsorbe une grosse quantité de 2,4-dinitrophénol.

CHAPITRE VI

HYDROLYSE DE LA LAINE PAR LA PAPAÏNE CRISTALLISEE.

Les différents auteurs (SCHÖBERL (62), BLACKBURN (63), LENNOX (64) qui ont étudié l'action de la papaïne sur la laine ont utilisé des papaïnes commerciales impures ou partiellement purifiées. En 1954, KIMMEL et SMITH (65) ont décrit une méthode de préparation de la papaïne cristallisée à partir de produits commerciaux : nous avons donc pensé qu'il serait intéressant d'étudier pour la première fois l'hydrolyse de la laine par cet enzyme cristallisé.

A - Préparation de la papaïne cristallisée.

Nous avons préparé la papaïne cristallisée d'après les indications de KIMMEL et SMITH.

On mélange dans un mortier de la papaïne commerciale (+) (180 g) avec de la célite (100 g) et du sable (150 g), on malaxe ensuite ce mélange avec 200 à 300 ml de cystéine 0,04 M amenés à pH 5,5 par addition de soude. Après avoir laissé reposer un certain temps, on décante le liquide surnageant et on extrait de nouveau le résidu restant dans le mortier avec 300 ml de solution de cystéine, on décante comme précédemment et on lave le mortier avec la solution de cystéine, de façon à utiliser un litre de solution pour les extractions et lavages.

On obtient ainsi une suspension que l'on filtre sur un entonnoir Buchner. Le filtrat est ajusté à pH 9 par addition de Na OH 1N ce qui provoque la formation d'un précipité grisâtre que l'on élimine par centrifugation. Dans le liquide surnageant on ajoute du sulfate d'ammonium cristallisé de façon à obtenir une concentration en sel de 25%. Cette solution est conservée 2 heures à 4°C, elle laisse déposer progressivement un précipité blanc

---

(+) qualité PROLABO, titre 80.

que l'on recueille par centrifugation. Ce précipité, après avoir été lavé par 400 à 500 ml de solution de sulfate d'ammonium à 25 %, est redissout dans 600 ml de cystéine 0,02 M (pH 7). Dans cette solution on ajoute lentement 60 g de Cl Na solide, par conservation à 4° la papaïne précipite, on centrifuge de nouveau, en chambre froide, et le solide recueilli est mis en suspension dans 100 ml de cystéine 0,02 M (pH 6,5); à 4° cette suspension cristallise nettement.

C'est cette suspension de papaïne cristallisée que nous avons utilisée dans nos expériences d'hydrolyse.

B - Hydrolyse papaïnique de la laine en présence de bisulfite.

LENNOX (1952) (66) a montré que la papaïne en l'absence d'agent réducteur n'hydrolyse pas la laine, car l'agent réducteur réalise à la fois une indispensable activation de l'enzyme et une augmentation de la réactivité du substrat par rupture des liaisons disulfures.

Nous avons donc étudié la cinétique de la solubilisation de laine, par la papaïne cristallisée, dans les conditions suivantes. Des échantillons de 2 g de laine (poids anhydre) sont traités par 100 ml d'une solution de bisulfite de sodium à 1 % (amenée à pH 7 par addition de bicarbonate de sodium) contenant 0,02 g % de papaïne; comme dans les essais avec la pepsine, le rapport enzyme/substrat est de 1/100. Les hydrolyses sont réalisées à l'étuve à 37° C (+) pendant des temps variables. Le résidu est ensuite filtré sur un entonnoir en verre fritté, lavé abondamment à l'eau distillée, séché à l'étuve à 105 ° C et pesé. Les résultats sont résumés dans le tableau XVI. On peut voir que l'hydrolyse par la papaïne-bisulfite est beaucoup plus rapide que l'hydrolyse par la pepsine-bisulfite ( tableau XLV); mais dans les deux cas on arrive à un résidu ( 20 à 25 %) inattaquable par l'enzyme en milieu réducteur, et qui est constitué essentiellement par les cellules corticales de la fibre.

---

(+) La température optimum d'action de la papaïne est voisine de 70°C. Nous avons cependant opéré à 37°C, pour pouvoir comparer les cinétiques d'hydrolyse avec celles de l'hydrolyse pepsique.

TABLEAU - XVI

Cinétique de la solubilisation de la laine par la papaïne  
(température 37°C ).

Temps en heures	Laine solubilisée (+) en %
2	3,8
4	10,9
8	21,2
16	25,8
24	39,6
48	51,5
8 jours	59,1

(+) En 24 heures, mais à 70° C, 80 % de la laine se solubilisent.

C - Etude électrophorétique de l'hydrolysate papaïnique.

Cette étude a été réalisée sur un hydrolysate de 18 heures à 70° C; dans ces conditions, l'enzyme solubilise la plus grande partie de la fibre; seules les cellules corticales ne sont pas attaquées. Cet hydrolysate, par ajustement à pH 4, donne un précipité constitué par un polypeptide ou un groupe de polypeptides pauvre en soufre (polypeptide A de BLACKBURN) (67). On peut difficilement redissoudre ce précipité en milieu alcalin et son étude électrophorétique s'est révélée impossible. La solution résiduelle est dialysée dans un boudin de cellophane pendant six jours : on obtient de cette façon deux fractions, l'une adialysable, l'autre dialysable. La fraction dialysable peut être séparée en deux sous-fractions par passage sur une résine à échange de cations (Amberlite IR 120, sous forme H<sup>+</sup>); l'une des fractions est retenue et éluée par l'ammoniaque 2 N (Dialysable A), l'autre n'est pas fixée par la résine (Dialysable B). Ces trois fractions (Adialysable, Dialysables A et B) ont été étudiées par électrophorèse sur papier à

pH 3,9 (tampon pyridine/acide acétique). La révélation a été obtenue par pulvérisation de ninhydrine à 0,1 % dans le n-butanol saturé d'eau, suivie d'un chauffage de 15 minutes à 100°C.

Les électrophorogrammes obtenus ont été analysés à l'aide d'un densitomètre Photovolt, équipé d'un filtre vert à 530 m $\mu$  (voir figure 23)

Toutes les fractions sont très hétérogènes et contiennent de nombreux groupes de peptides différents.

La complexité de ces diverses fractions ne nous a pas permis de pousser plus loin notre investigation.

D - Hydrolyse papaïnique de laines dont on a modifié  
les liaisons disulfures.

Nous avons également comparé les cinétiques d'hydrolyse de deux échantillons de laine dont on a modifié au préalable les liaisons disulfures.

Un échantillon de laine a été oxydé par l'acide peracétique dans des conditions exposées plus haut.

L'autre échantillon a été traité pendant 24 heures à la température du laboratoire par une solution de soude 0,1 N ( rapport  $\frac{\text{laine} = 1}{\text{solution} = 400}$  ). puis rincé. PHILLIPS (68) a montré que dans ces conditions une partie des liaisons disulfures de la laine est remplacée par des liaisons thioéthers qui ne sont plus réductibles par le bisulfite de sodium. Effectivement, le dosage indique que la teneur en soufre (thiol + disulfure) de l'échantillon est de 1,9 % ( la teneur en soufre, -thiol+disulfure,- de la laine intacte est de 3,13 %).

Les conditions d'hydrolyse sont celles exposées au paragraphe B, la température a été fixée à 40°C.

L'examen du tableau XVII montre que l'hydrolyse papaïnique d'une "laine oxydée " est beaucoup plus rapide que celle d'une "laine réduite " et ceci est tout à fait comparable à l'hydrolyse pepsique. Dans le cas de la

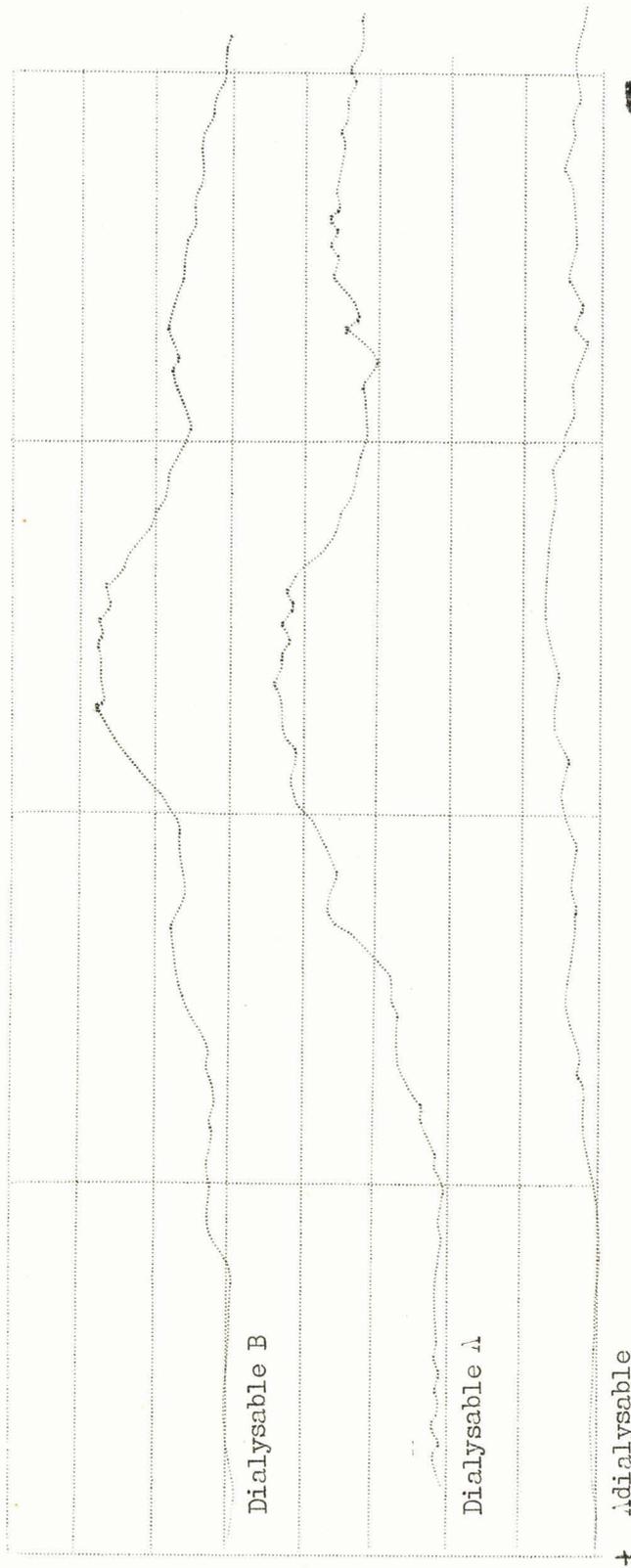


FIGURE - 23

Electrophorégramme d'un hydrolysate papainique de laine  
(analysé au densitometre Photovolt).



laine oxydée, la solubilisation est complète; on n'observe même pas l'apparition de la "subcuticule" d'ALEXANDER, comme dans l'hydrolyse pepsique; il reste simplement en suspension dans l'hydrolysate des fragments épars d'épicuticule.

TABLEAU - XV11

Cinétique de la solubilisation de laines modifiées chimiquement  
au cours de l'hydrolyse papaïnique (température 40°C).

Temps en heures	"Laine réduite " solubilisée en %	"Laine oxydée " solubilisée en %	" Laine traitée par la soude " (+) solubilisée en %
4		21	
8	27	51	14
16		71	
48	52	100	35

(+) Un échantillon de laine traité pendant 16 heures par une solution de cyanure de potassium 0,1 M à 66°C est encore plus résistant à l'hydrolyse papaïnique, puisque 24 % seulement se solubilisent en 48 heures.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux de LENNOX (1953) (69), qui obtient également une solubilisation complète de la laine par une solution de papaïne-bisulfite, contenant une forte proportion d'urée (concentration 4 M en urée).

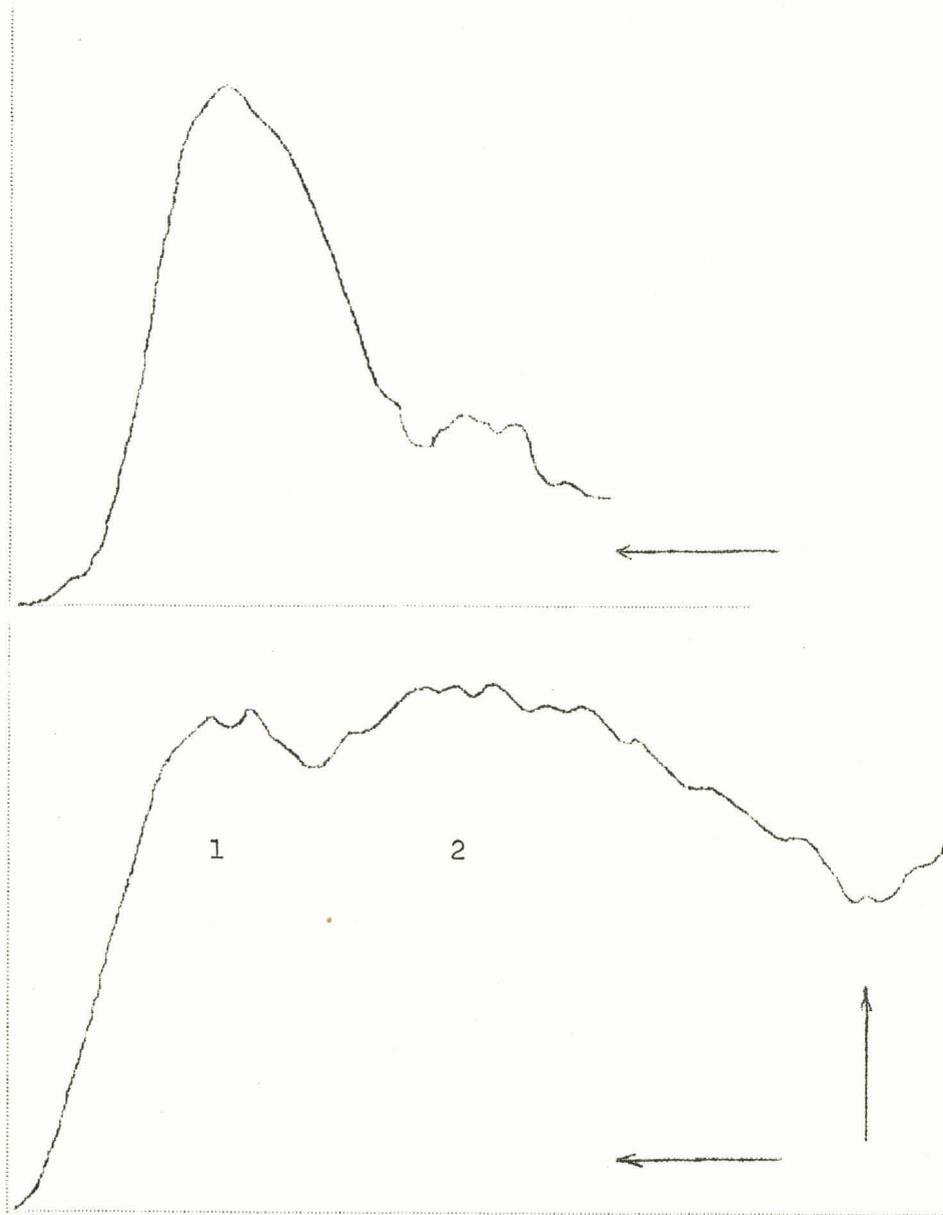
Au contraire, lorsqu'une partie de la cystine a été remplacée par de la lanthionine (laine traitée à la soude ou au cyanure de potassium), l'hydrolyse papaïnique est très nettement ralentie.

E - Etude électrophorétique de l'hydrolysats papaïnique  
de laine oxydée.

Le polypeptide qui précipite par ajustement à pH 4 d'un hydrolysats papaïnique de laine intacte, est insoluble en milieu ammoniacal et ne peut donc être étudié en électrophorèse. Au contraire, les précipités obtenus à pH 4 à partir d'hydrolysats papaïniques de laine oxydée sont facilement redissous dans l'ammoniaque à 2 % ( la laine oxydée est également soluble dans l'ammoniaque; voir à ce sujet ALEXANDER)(70).

Les précipités obtenus à pH 4 ont donc été étudiés en électrophorèse sur papier à pH 8,9 (durée de passage du courant 8 heures sous 120 Volts). La révélation est obtenue par coloration à l'Amidoschwartz 10 B.

Pour des temps courts d'hydrolyse enzymatique (4 heures à 40 °C), on observe une seule bande assez diffuse (voir figure 24); au contraire, pour des temps prolongés d'hydrolyse (48 heures), c'est-à-dire lorsque pratiquement toute la laine est solubilisée, l'aspect observé est beaucoup plus hétérogène : on aperçoit deux groupes de composés ( 1 et 2 de la figure 24). L'un (composé 1) possède une vitesse de migration analogue au composé unique obtenu dans les temps courts d'hydrolyse; l'autre (composé 2) est nouvellement apparu. La composition de ce groupe de peptides précipitables est donc variable en fonction du temps, comme le groupe de polypeptides thermosolubles isolés au cours de l'hydrolyse acide ménagée (voir plus haut).



BUS  
LILLE

FIGURE - 24

Electrophorégrammes des précipités obtenus à pH 4 à partir d'hydrolysats papaïniques de laine oxydée.

En haut : Après 4 heures d'hydrolyse.

En bas : Après 48 heures d'hydrolyse.

F - Hydrolyse papaïnique de la DNP-laine.

La DNP-laine, préparée comme nous l'avons indiqué au chapitre V, n'est que très légèrement hydrolysée par la papaïne-bisulfite à 40°C, puisque en 24 heures, 7 % seulement de la protéine passent en solution : il n'y a pas libération de cellules corticales; on observe seulement au microscope une légère modification de la surface écailleuse des fibres, qui ont tendance à devenir lisses. Au contraire, si l'on dissout dans la solution papaïne-bisulfite de l'urée, de façon à obtenir une concentration 3 fois moléculaire en urée, l'hydrolyse de la DNP-laine devient beaucoup plus importante : en effet, en 24 heures, 70 % de la protéine passent en solution. L'hydrolysate est fortement coloré en jaune et le résidu est constitué essentiellement par les cellules corticales. Il est assez curieux que LENNOX (1955) (71) n'ait pas réussi à solubiliser une DNP-laine dans une solution de papaïne-bisulfite-urée : l'enzyme non purifié qu'il utilise est peut être moins actif que notre papaïne cristallisée.

De l'hydrolysate obtenu par action du système papaïne-bisulfite-urée sur la DNP-laine, on peut séparer des DNP-peptides solubles dans l'alcool isoamylique et dans le n-butanol. En électrophorèse sur papier, ces DNP-peptides se séparent en deux groupes distincts.

Conclusions sur l'hydrolyse enzymatique de la laine.

L'ensemble de notre expérimentation sur l'hydrolyse pepsique et papaïnique de la laine nous amène aux conclusions suivantes :

1°) Pour des concentrations identiques en enzyme et en bisulfite, et pour la même température d'action (37°C), la papaïne est beaucoup plus active que la pepsine : ainsi la pepsine solubilise environ 40 % de la laine en 3 jours (tableau XIV), alors que la papaïne solubilise cette même quantité en 1 jour seulement (tableau XVI). Si l'on opère avec la papaïne au voisinage de sa température optimum d'action (70°C), l'hydrolyse est encore beaucoup plus rapide.

Cependant la pepsine dégrade plus profondément les protéines de la fibre, puisque les hydrolysats pepsiques ne précipitent pas avec l'acide trichloracétique, alors que les hydrolysats papaïniques donnent par acidification à pH 4 un précipité gélatineux qui représente environ 10 % de la fraction solubilisée. Ce précipité est pauvre en soufre (1,6 %). Ce point est à rapprocher des observations que nous avons faites lors de l'hydrolyse sulfurique de la laine; les hydrolysats sulfuriques contiennent des "polypeptides thermosolubles" plus pauvres en soufre que la laine dont ils proviennent.

2°) Les liaisons disulfures jouent un rôle primordial dans la susceptibilité du substrat vis-à-vis de l'enzyme. En effet, en l'absence de tout agent susceptible de couper les ponts disulfures, la pepsine n'hydrolyse que 11 % de la laine, et la partie de la protéine à laquelle elle s'attaque est très pauvre en cystine. On peut même émettre l'hypothèse que cette fraction solubilisée contient des ponts disulfures intrapeptidiques, comme ceux qui ont été mis en évidence dans l'insuline ou l'ocytocine.

Au contraire, en présence de bisulfite, -agent réducteur qui coupe les liaisons disulfures,- la pepsine aussi bien que la papaïne solubilisent environ 75 % de la fibre et laissent un résidu constitué essentiellement par les cellules corticales et des fragments de la cuticule (sans doute l'épicuticule).

Si ces cellules corticales ne sont pas hydrolysées par les enzymes en présence de bisulfite, c'est que, vraisemblablement, le réducteur n'est pas capable, - pour des raisons de structure moléculaire, - de couper les liaisons disulfures qu'elles contiennent (+). En effet, si l'on oxyde toutes les liaisons disulfures de la fibre, il n'y a jamais libération de cellules corticales au cours de l'hydrolyse enzymatique et la solubilisation est rapide et pratiquement totale. De même, le système papaïne-bisulfite en présence d'urée (LENNOX 1951) (72) solubilise les cellules corticales : on peut donc admettre que l'urée, en coupant les liaisons hydrogène de la protéine, - ou des protéines, - constituant les cellules, provoque une dislocation du réseau moléculaire permettant ainsi au bisulfite d'atteindre et de couper les ponts disulfures; l'enzyme peut alors hydrolyser les liaisons peptidiques.

3°) La dinitrophénylation rend la laine pratiquement inattaquable par les enzymes en milieu réducteur, et l'on peut penser que les groupements dinitrophénylés fixés sur les chaînes polypeptidiques provoquent la création de nouvelles liaisons hydrogène, qui renforcent le réseau moléculaire et protègent ainsi les liaisons disulfures : en présence d'urée, les liaisons hydrogène étant rompues, l'hydrolyse enzymatique devient possible; il en est de même si l'on oxyde les liaisons disulfures. Il est intéressant de rappeler ici, que FARNWORTH (1955) (73) a montré que dans une laine traitée à l'isocyanate de phényle, les liaisons disulfures ne sont plus réactives vis-à-vis du bisulfite et des alcalis. Nous avons également constaté qu'une DNP-laine, oxydée par l'acide peracétique, gonfle mais ne se dissout pas dans l'ammoniaque 0,1 N, alors que la laine oxydée s'y dissout facilement (ALEXANDER (74) ).

4°) Enfin, les études chromatographiques ou électrophorétiques des divers hydrolysats enzymatiques révèlent leur très grande complexité, et il ne semble pas possible d'isoler de ces hydrolysats des peptides suffisamment caractéristiques, pour que l'on puisse espérer obtenir de leur étude des renseignements intéressants sur la structure de la molécule de kératine elle-même.

---

(+) Il est possible que la fraction (C+D) la moins réactive de la cystine de la laine (voir 1ère partie, chapitre 11) appartienne surtout aux cellules corticales.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

L'ensemble de nos recherches a porté sur l'étude de la structure chimique de la kératine de laine.

L'établissement de cette structure suppose que l'on détermine la séquence des acides aminés dans les différentes chaînes polypeptidiques et la nature des liaisons qui peuvent exister entre ces chaînes. Actuellement, ce travail n'a été réalisé que pour quelques protéines de structure relativement simple et qui sont plutôt des polypeptides que des protéines vraies : insuline, hormone adrénocorticotrope, etc.; il a néanmoins exigé l'isolement de très nombreux peptides, obtenus par hydrolyse partielle de la protéine.

Nous ne pouvions envisager de réaliser ce travail pour la laine, car nous n'avons, pour le moment, aucun moyen de fractionner la fibre en ses protéines constitutives, et nous nous trouvons donc devant la nécessité peu encourageante d'aborder les études de structure sur un mélange plus ou moins complexe de kératines. Nous avons donc cherché à dégrader les protéines de la fibre par des agents spécifiques d'hydrolyse, dans l'espoir d'isoler des fragments polypeptidiques à caractéristiques suffisamment marquées, qui pourraient nous donner quelques renseignements sur la structure des protéines dont ils dérivent.

C'est ainsi que nous avons pu montrer que l'acide sulfurique décinormal, agissant à la température d'ébullition sur la laine ou sur les cellules corticales, solubilise très lentement une fraction azotée complexe, comprenant des acides aminés libres, parmi lesquels prédomine très nettement l'acide aspartique, et un ensemble de petits et gros peptides caractérisés par leur pauvreté relative en soufre et leur richesse en tyrosine. Après 64 heures d'action de l'acide sulfurique, on obtient un résidu insoluble, difficilement hydrolysable, très riche en cystine, riche en proline, pauvre en tyrosine et presque dépourvu d'acide aspartique.

Par ailleurs, nos résultats expérimentaux montrent très nettement que la résistance à l'hydrolyse chimique ou enzymatique provient bien de l'existence, de l'intégrité et de la répartition dans les chaînes peptidiques des liaisons disulfures. Ainsi, lorsqu'on oxyde la laine par l'acide peracétique, l'hydrolyse sulfurique ménagée devient beaucoup plus rapide.

Nos résultats sur l'hydrolyse enzymatique par la pepsine ou la papaïne, démontrent également l'importance de ces liaisons disulfures. La pepsine n'hydrolyse que 10 % d'une laine dont les liaisons disulfures sont intactes, mais il est remarquable que la fraction solubilisée soit très pauvre en soufre, et on peut supposer que les liaisons disulfures de cette fraction soluble sont intrapeptidiques comme certaines des liaisons disulfures de l'insuline.

D'autre part, l'hydrolyse enzymatique en présence de bisulfite de sodium libère toujours les cellules corticales qui sont inattaquables, dans ces conditions, par la pepsine ou la papaïne; mais si l'on coupe au préalable les liaisons disulfures de la laine par oxydation (ou si l'on opère en milieu réducteur en présence d'urée), les cellules corticales sont alors hydrolysées comme le reste de la fibre. Or, PHILLIPS (75) (voir plus haut) a montré que le bisulfite de sodium ne coupe qu'une partie des liaisons disulfures de la fibre, tandis que l'acide peracétique oxyde l'ensemble de ces liaisons (ALEXANDER) (76); dès lors, on peut conclure que la résistance de la kératine de laine, et spécialement celle des cellules corticales, à l'hydrolyse enzymatique est conditionnée uniquement par l'intégrité des liaisons disulfures. Il est intéressant de rappeler ici que la chymotrypsine n'hydrolyse complètement l'insuline qu'après oxydation des liaisons disulfures.

Nos résultats sur l'hydrolyse acide ménagée des cellules suggèrent que la kératine dont elles sont formées doit avoir finalement une structure chimique assez peu différente de celle des autres constituants protéiniques de la fibre. Il est vraisemblable qu'elles sont plus riches en liaisons hydrogène (puisque'il suffit d'ajouter de l'urée pour que le système papaïne-bisulfite puisse alors les hydrolyser) et que leurs liaisons disulfures sont plus fortement soumises à l'empêchement stérique.

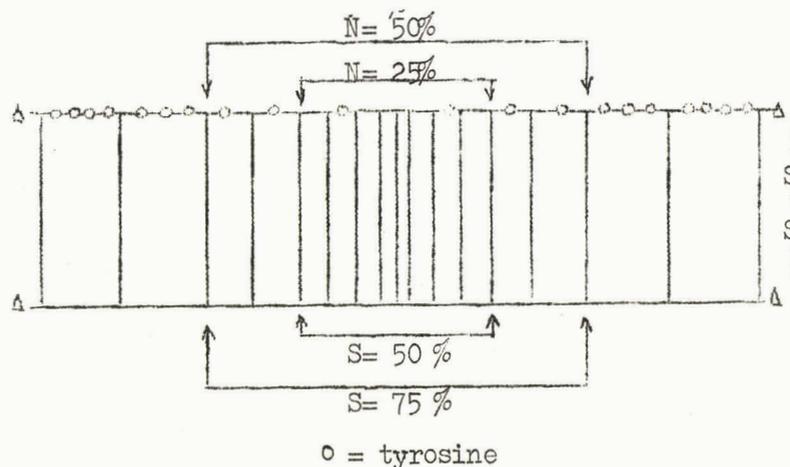


FIGURE- 25

Représentation schématique de deux chaînes polypeptidiques de la kératine, unies par des liaisons disulfures.

En nous appuyant sur les résultats que nous venons de résumer, il nous est possible de proposer une représentation schématique de la structure générale des molécules des kératines de laine (voir figure 25). On peut admettre que les molécules sont formées par l'association d'un certain nombre de chaînes peptidiques différentes, réunies entre elles par des ponts disulfures. Ces ponts, dont le nombre augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'extrémité des chaînes, forment un réseau très dense au niveau des régions "médiannes", en conférant à ces zones une résistance particulière vis-à-vis des agents d'hydrolyse. Ces régions médianes sont également plus riches en proline. Inversement, les restes de tyrosine sont plus nombreux aux extrémités des chaînes et restent clairsemés dans les régions centrales. L'enlèvement de la presque totalité de l'acide aspartique, sous forme d'acide libre, ne démolit pas cet édifice macromoléculaire, qui peut être formé de fragments

de chaînes peptidiques encore solidaires les unes des autres par de nombreuses liaisons disulfures.

Lorsque les liaisons disulfures sont intactes, l'hydrolyse acide ou pepsique libère préférentiellement les parties périphériques "extranucléaires", tandis que la réduction et spécialement l'oxydation font disparaître les zones de résistance. Il est d'ailleurs possible que certaines liaisons disulfures soient intrapeptidiques.

MIDDLEBROOK (1951)(77) a également proposé un modèle moléculaire comportant un certain nombre de sous-unités, où il existait également des zones "à grande densité de cystine".

D'autres observations viennent aussi confirmer cette hypothèse, notamment celles de STAHL (1950 (78), qui obtient, au cours de la dégradation microbienne de la laine par Microsporum Gypseum, un "noyau" inattaquable représentant 55 % de l'azote initial et 75 % du soufre total, donc plus riche en soufre que la laine originale. D'autre part, pour MERCER et ses collaborateurs (79), le cortex de la fibre serait formé de deux types différents de kératine: une kératine plus stable (le paracortex), car riche en liaisons disulfures, et une kératine moins stable (l'orthocortex) pauvre en liaisons disulfures. Enfin, GILLESPIE et LENNOX (80) ont trouvé que 70 % seulement de la kératine de laine se solubilisent dans le thioglycolate alcalin; les 30 % restants y sont insolubles. Il est également intéressant de rappeler que CONSDEN et GORDON (1950) (81), en étudiant les dipeptides d'un hydrolysate partiel de laine, ont trouvé que la cystine pouvait être associée à n'importe quel acide aminé, sauf toutefois à la tyrosine.

La maquette moléculaire de la kératine de laine que nous proposons, avec ses régions "nucléaires" à haute densité de cystine et ses régions "extranucléaires" riches en tyrosine, nous semble traduire assez fidèlement l'ensemble des connaissances très fragmentaires que nous possédons actuellement.

Nous pensons poursuivre ce travail par des essais d'isolement, à partir du "noyau" riche en soufre, de peptides à cystine d'une longueur de chaîne suffisamment grande, en espérant que l'étude de leur séquence en acides aminés fournira des renseignements sur la fréquence de l'apparition des résidus de cystine dans les chaînes polypeptidiques de la kératine de laine.

B I B L I O G R A P H I E

- 39.- ACHER (R.), JUTISZ (M.) et FROMAGEOT (C.), Biochim. Biophys. Acta, 1950, 5, 493.
- 31- 70- 74.- ALEXANDER (P.) et EARLAND (C.), Nature, 1950, 166, 396.  
Textile Research J., 1950, 20, 298.
- 34.- ALEXANDER (P.) et HUDSON (R.F.), Wool :ist chemistry ans physics. (Chapman et Hall éditeurs) 1954, p.345.
- 60 -76.- ALEXANDER (P.), HUDSON (R.F.) et FOX (M.), Biochem.J., 1950, 46, 27.
- 11.- BISERTE (G.), BOULANGER (P.) et COURTOT (F.), Bull. Soc. Chim. Biol. 1952, 34, 366.
- 36.- BISERTE (G.) et OSTEUX (R.), Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 50.
- 54.- BISERTE (G.), Thèse Doct. Sciences Naturelles, Lille, 1952.
- 13.- Blackburn (S.), 287<sup>o</sup> Réunion de la Biochemical Society.
- 35- 49- 63- 67.- BLACKBURN (S.), Biochem. J., 1950, 47, 443.
- 10.- BOULANGER (P.), BISERTE (G.), Bull. Soc. Chim. Biol. 1950, 32, 601.
- 17.- CARLENE (P.W.), ROWEL (F.M.) et SPEARMAN (J.B.), J. Soc. Dyers Colourists, 1946, 62, 329.
- 81.- CONSDEN (R.) et GORDON (A.H.), Biochem. J., 1950, 46, 8.
- 5.- CRISTOL (P.), FOURCADE (J.) et BENEZECH (C.), Bull. Soc. Chim. Biol. (travaux) 1941, 23, 112.
- 20- 22.- CUTHBERTSON (W.R.) et PHILLIPS (H.), Biochem. J., 1945, 39, 7.
- 9- 21- 56.- DENT (C.E), Biochem.J., 1948, 43, 169.
- 14.- DESNUELLE (P.) et BONJOUR (G.), C.R. Soc. Biol., 1950, 144, 1077.
- 57.- DESNUELLE (P.) et ROVERY (M.), Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 450.
- 24.- ELÖD (E.), NOWOTNY (H.) et ZAHN (H.), Kolloïd Z., 1940, 93, 50; 1942, 100, 297.
- 45- 53.- ELÖD (E.) et ZAHN (H.), Melliland Textilber., 1946, 27, 68.
- 73.- FARNWORTH (A.J.), Biochem. J., 1955, 59, 529.  
1955, 60, 626.
- 2.- FOLIN (O.) et LOONEY (J.M.), J. Biol. Chem., 1922, 51, 421.
- 33.- FRASER (R.D.B.) et ROGERS (G.E.), Textile Research J., 1955, 25, 235.

- 43.- FROMAGEOT (C.) et PORCHARD , C.R. Ac. Sc. 1931, 193, 738.
- 55.- FROMAGEOT (C.), JUTISZ (M.) et LEDERER (E.), Biochim. Biophys. Acta, 1948, 2, 487.
- 46.- GEIGER (W.B.), PATTERSON (W.I.), MIZELL (L.R.) et HARRIS (M.), J. Res. N.B.S., 1941, 27, 459.
- 80.- GILLESPIE (J.M.) et LENNOX (F.G.), Australian J. Biol. Sci., 1955, 8, 97.
- 7.- GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.M.) et CONSDEN (R.), Biochem. J., 1944, 38, 224.
- 29.- GRASSMANN (W.) , HANNIG (K.) et PLÜCK (M.), Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem., 1955, 299, 258.
- 25.- HARRIS (M.) et SMITH (A.L.), Amer. Dyest. Rcp. 1936, 25, 542.
- 59.- KERN et HERRIOT (R.M.), Federation Proc., 1953, 12, 229.
- 65.- KINMEL (J.R.) et SMITH (E.L.), J. Biol. Chem., 1954, 207, 515.
- 4.- KOLB (J.) et TOENNIES (G.), Anal. Chem., 1952, 24, 1164.
- 27.- LEES (K.) et ELSWORTH (F.F.), J. Soc. Dyers Colourists, 1952, 68, 207.
- 47-50-52-64 - LENNOX (F.G.), Australian J. Biol. Sci. série B 1952  
66-69-72.- 5, 189.
- 71.- LENNOX (F.G.), Textile Research J., 1955, 25, 676.
- 51.- LINDERSTRÖM-LANG (K.) et DUSPIVA (F.), Z. physiol. Chem. 1935, 237, 131; 1936, 241, 177.
- 23.- LINDLEY (H.) et PHILLIPS (H.), Biochem. J., 1945, 39, 7
- 6.- LUGG (J.W.H.), Biochem. J., 1937, 31, 1422.
- 79.- MERCER (E.H.), GOLDEN (R.L.) et JEFFRIES (E.B.), Textile Research J., 1954, 24, 615.
- 42.- MEUNIER (P.), CHAMBERD et COMTE , C.R. Ac. Sc. 1927, 184, 1208.
- 37-77.- MIDDLEBROOK (W.R.), Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 547.
- 8.- PARTRIDGE (S.M.), Biochem. J., 1948, 42, 238.
- 12-38.- PARTRIDGE (S.M.), et DAVIS (H.F.), Nature, 1950, 165, 62.
- 16.- PERYMAN (R.V) , J. Soc. Dyers Colourists, 1954, 70, 83.
- 58-68-75.- PHILLIPS , "Fibrous Proteins " Symposium of the Society of Dyers and Colourists. Bradford, 1946, p.39.
- 15.- PIGACHE (P.) et BISERTE (G.), Bull, Inst. Textile France, 1951, n°29, 37.
- 61.- SANGER (F.), Biochem. J., 1945, 39, 507.
- 48-62.- SCHÖBERL (A.) et HAMM (R.), Biochem. Ztschr. 1948, 318, 331 et 355.

- 1.- SHINOHARA (K.), J. Biol. Chem. 1935, 109, 665;  
1936, 112, 671 et 683.
- 3.- SPEAKMAN (J.B.) et PARK (G.S.), Bull. Inst. Textile France,  
1951, n°30, 255.
- 41.- SPEAKMAN (J.B.) et ELLIOT (G.H.) "Fibrous Proteins " Symposium  
of the Society of Dyers and Colourists, Brad-  
ford, 1946, p.116.
- 78.- STAHL (W.H.), Arch. Biochem. 1950, 27, 211.
- 40-44.- STAKHEYEWA-KAVERZNEWA (C.) et GAVRILOW (W.L.), Bull. Soc. Chim.  
Fr. 1937, 4, 647.
- 26.- VANOVERBEKE (M.), LEFEBVRE (L.) et RAUX (L.), Bull. Inst. Textile  
France, 1950, n°22, 53.
- 28-30.- VANOVERBEKE (M.), MAZINGUE (G.) et DESPRETS (P.), Bull. Inst.  
Textile France, 1954, n°50, 17.
- 18.- ZAHN (H.) et HASELMANN , Melliand Textilber., 1950, 31, 481.
- 19.- ZAHN (H.) et MEIENHOFER (J.), Textile Research J., 1955,  
25, 738.
- 32.- ZAHN (H.) et HASELMANN, Melliand Textilber., 1950, 31, 225.

