

## Sur la désagrégation des protides par les amides.

### Désagrégation de la caséine dans l'acétamide

par E. Cherbuliez et G. de Mandrot.

(22. XII. 30.)

#### I. INTRODUCTION.

L'étude de la désagrégation hydrolytique des matières protéiques a conduit à deux constatations très générales: les protides donnent par hydrolyse essentiellement des acides aminés; dans la molécule primitive, le lien peptique,  $\text{—CO—NH—}$ , résultant de la formation d'une fonction amide d'acyle entre le groupe amino d'une première et le groupe carboxyle d'une seconde molécule d'amino-acide, joue un rôle prépondérant. Ces constatations sont loin d'avoir résolu le problème de la constitution des matières protéiques. La question de l'existence de chaînes ouvertes ou fermées dans la molécule primitive, celle du rôle éventuel de fonctions éther-sel dans leur structure générale, ne sont pas encore tranchées. Il se pose finalement un problème extrêmement important au sujet de la grandeur de la molécule des matières protéiques. Ce problème est actuellement en discussion pour de nombreux principes immédiats des règnes animal et végétal, tels que les hydrates de carbone ou le caoutchouc; ce débat ne saurait être tranché par des arguments d'ordre physique; en particulier, on ne peut tirer des conclusions absolues des déterminations de «cellules élémentaires» par l'étude aux rayons *Roentgen*. Les arguments chimiques doivent jouer un rôle déterminant dans cette question.

Dans cet ordre d'idées, il nous a semblé utile de chercher à réaliser la désagrégation des protides par une voie nouvelle, tout-à-fait différente de l'hydrolyse. Les efforts faits dans cette direction sont nombreux. Ainsi *Troensgaard*<sup>1)</sup> a obtenu des résultats très intéressants par l'étude de la réduction des protides par l'hydrogène naissant, après acétylation. Au lieu d'obtenir avant tout des fragments à chaîne ouverte (comme par l'hydrolyse), on aboutit à un mélange dans lequel les dérivés hétérocycliques sont prédominants. Mais la suite de réactions adoptée ne permet guère de tirer des conclusions quant à la grandeur de la molécule primitive.

---

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. 112, 86 (1920); 127, 137 (1923) et d'autres travaux dans ce même journal.

Nous nous sommes proposé de tenter une «dép polymérisation»<sup>1)</sup> dans des conditions dans lesquelles une action chimique de tout réactif devait être évitée autant que possible; l'étude des produits de dép polymérisation devait montrer si ces derniers présentaient des caractères chimiques nouveaux, différents de ceux de la matière primitive, ou non. Dans le premier cas, on pourra conclure à une différence essentielle dans la constitution de la matière première et de ses produits de dép polymérisation, et écarter l'hypothèse d'une simple association; dans le second cas, si les différences se limitaient à ce qui devait résulter du changement de grandeur des molécules lors du passage d'une molécule petite à un produit d'association de dimensions considérables, l'hypothèse d'une association de molécules sans intervention de valences principales devenait plus probable.

La transformation de la molécule protéique en fragments plus petits, sans intervention d'un agent chimique, a été tentée par l'action de la chaleur. *Pictet* et *Cramer*<sup>2)</sup> ont appliqué à un protide, l'ovalbumine, le procédé de distillation dans le vide qui avait été, dans les mains de *Pictet*, si fertile en résultats pour la chimie de la houille et des hydrates de carbone. Ces auteurs ont constaté qu'il se produisait une décomposition tellement profonde, dans ces conditions, que l'étude des produits obtenus ne fournit guère de données nouvelles pour le problème que nous discutons. Reprenant un mode opératoire que *Pictet* avait introduit dans l'étude de l'amidon, *Shibata*<sup>3)</sup> a soumis des matières protéiques en solution glycérinée à l'action de la chaleur. Par une chauffe de 10 heures à 180—190°, il a pu transformer par exemple la caséine avec un bon rendement en un mélange de substances cristallines solubles dans des dissolvants organiques, présentant un poids moléculaire faible. Ces produits de désagrégation ne donnent plus la réaction du biuret, mais donnent encore celle des groupes carbonyle; comme ils ne sont formés ni de peptides à chaînes ouvertes ni d'acides-amino, l'auteur admet qu'il s'agit d'un mélange de dicéto-pipérazines. Comme d'autre part, par une chauffe dans le même véhicule, à des températures plus basses, les produits de cette désagrégation peuvent être retransformés en produits présentant une solubilité colloïdale dans l'eau et donnant

<sup>1)</sup> Ce terme de «dép polymérisation» n'est pas tout à fait exact. Il ne s'agit pas de la transformation d'une grande molécule en fragments tous identiques entre eux, comme c'est le cas par exemple dans la transformation du poly-oxy méthylène en aldéhyde formique; la transformation visée dans notre cas devra aboutir à des fragments plus petits que la molécule primitive, de grandeur variable; ces fragments ne seront pas identiques entre eux et n'appartiendront même pas nécessairement au même type de corps. Pour abréger, nous nous servirons néanmoins du terme de dép polymérisation dans le sens que nous venons d'indiquer.

<sup>2)</sup> *Helv.* **2**, 188 (1919)

<sup>3)</sup> *Acta phytochim.* **2**, 193 (1927), cité d'après *C.* **1927**, II, 2199.

de nouveau la réaction du biuret, *Shibata* considère ces corps comme produits par une simple dépolymérisation de la matière protéique primitive, et il voit dans cette « dépolymérisation » réversible une preuve de ce que certains protides tels que la caséine sont formés par l'association de molécules plus petites.

La formation des dérivés de *Shibata* exige l'action très prolongée d'une température assez élevée; la dégradation s'accompagne d'une perte appréciable d'azote sous forme d'ammoniac; dans certains cas, comme celui de la kératine, il y a aussi départ de soufre sous forme de combinaison organique. La réaction étudiée par cet auteur semble dès lors s'accompagner d'une décomposition très nette, ce qui infirme évidemment les conclusions qu'on pourrait tirer de ses résultats en ce qui concerne le problème de la grandeur de la molécule protéique.

Une classe de corps dont l'action désintégrante sur certaines matières protéiques est très remarquable est celle des phénols. Les scléroprotéines notamment, comme l'a montré *Herzog*<sup>1)</sup>, sont désagrégées par ces agents avec production de corps de poids moléculaire faible. Nous n'avons cependant pas pu trouver d'indication sur l'étude chimique des produits de désagrégation, annoncée par cet auteur. Il est cependant très probable qu'il s'agit ici encore d'un clivage de chaînes polypeptiques. Tout récemment, *Abderhalden* et *Heumann*<sup>2)</sup> ont montré l'instabilité de polypeptides en solution résorcinique. L'action des phénols semble d'ailleurs être particulièrement marquée précisément dans le groupe des scléroprotéines; ces corps, tout à fait insolubles dans tous les dissolvants, se distinguent très nettement des autres protides, et il serait imprudent de conclure des scléroprotéines aux autres matières protéiques.

La molécule protéique est caractérisée par la prédominance du groupement amide d'acyle,  $\text{—CO—NH—}$ . Comme, d'une manière générale, des corps à fonctions identiques possèdent une solubilité réciproque élevée, on pouvait espérer trouver dans les amides de bons dissolvants des protides. Les dicéto-pipérazines sont en effet facilement solubles dans l'acétamide à chaud. Ce raisonnement a conduit, il y a de cela déjà longtemps, *Ostromysslensky*<sup>3)</sup> à la constatation que des amides telles que la formamide ou l'acétamide avaient un pouvoir dissolvant remarquable pour les produits d'hydrolyse partielle des protides, les peptones, tandis que l'albumine y était insoluble. Mais une étude systématique du comportement des protides vis-à-vis des dissolvants de cette espèce ne semble pas avoir été faite.

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. **134**, 296 (1924); Helv. **11**, 529 (1928).

<sup>2)</sup> B. **63**, 1945 (1930).

<sup>3)</sup> J. pr. [2] **76**, 267 (1907).

Un examen rapide montre que les protides, insolubles dans les amides aux basses températures, y sont facilement désagregés à température plus élevée. Lorsqu'on suspend de la caséine dans de la formamide ou de l'acétamide, on n'observe, à la température du bain-marie, qu'un gonflement sans dissolution. Mais lorsqu'on porte ces mélanges à des températures de 150°, la suspension gélatineuse devient assez rapidement fluide et finit par se transformer en une solution parfaitement limpide. Ces deux amides ne sont pas les seules à présenter cette réaction; l'urée fondue, par exemple, maintenue à 140°, dissout également très bien les matières protéiques les plus variées.

Ce pouvoir désagrégeant des amides varie naturellement d'une amide à l'autre, aussi bien que d'une matière protéique à l'autre. L'acétamide se montre nettement plus efficace que la formamide, et l'urée de son côté a une action encore bien plus rapide que l'acétamide, bien que l'instabilité de l'urée aux températures élevées ne permet guère de dépasser 140° à 150° avec cette dernière. Quant aux protides, ce sont surtout les scléroprotéines qui montrent une résistance particulière à la désagregation par les amides. Ainsi, ces corps se différencient une fois de plus des autres matières protéiques. Dans le tableau suivant nous résumons des observations faites avec quelques représentants des scléroprotéines en présence d'acétamide à 200° et d'urée à 140°<sup>1)</sup>.

*Solubilités de scléroprotéines dans les amides.*

|                          | Acétamide 200°   | Urée 140° |
|--------------------------|--|-----------|
| Fibroïne . . . . .       | 28% après ½ h.   | soluble   |
| Kératine laine de chien  | difficilement solubilisée,<br>avec décomposition visible | „         |
| Kératine corne de bœuf . | difficilement solubilisée,<br>avec décomposition visible | „         |
| Elastine de bœuf . . .   | insoluble  | insoluble |

Ces résultats nous paraissent intéressants, surtout lorsqu'on les compare aux conceptions développées notamment par *Brill* et *Herzog*<sup>2)</sup> au sujet de la fibroïne de la soie. Examinées aux rayons X, les fibroïnes des différents vers à soie présentent toutes la même structure cristalline qui doit s'interpréter par la présence d'une cellule élémentaire de dimensions très faibles, correspondant à un

<sup>1)</sup> Voir *E. Cherbuliez* et *S. Ariel*, Arch. gen. [5] 11, suppl., 27 (1929).

<sup>2)</sup> *R. O. Herzog* et *W. Jancke*, Naturwissensch. 9, 288 (1921); *R. Brill*, A. 434, 204 (1923)

poids moléculaire de quelques centaines d'unités au maximum. Par traitement avec des phénols, on peut obtenir des solutions dans lesquelles la cryoscopie ou l'étude de l'équilibre de diffusion permet de constater la présence de petites molécules, toujours du même ordre de grandeur. On est donc conduit à admettre l'existence dans la fibroïne, et à raison de plus de 50 %, d'une fraction cristalline, de poids moléculaire d'environ 320, donnant à l'hydrolyse des amino-acides: comme il s'agit d'une substance neutre, cela ne pourrait guère être qu'une dicéto-pipérazine. Il est d'autant plus surprenant de constater la résistance de la fibroïne à l'acétamide à 200° que les dicéto-pipérazines sont assez solubles, à chaud, dans l'acétamide. Cette résistance est mise en évidence non seulement par le chiffre indiqué pour la fraction dissoute après une chauffe d'une demi-heure, mais encore par le fait qu'après ce premier traitement à l'acétamide, le résidu est devenu pratiquement insoluble dans ce dissolvant. Cette faible «solubilité» n'est guère compatible avec l'hypothèse que nous venons de rappeler, de la présence de plus de 50 % de dicéto-pipérazines simples dans la fibroïne.

Pour une étude systématique de l'action désagréante des amides sur les protides, dont nous publions ici les premiers résultats, nous nous sommes adressé à la caséine d'un côté, à l'acétamide de l'autre. Actuellement on ne peut plus considérer la caséine comme un corps homogène<sup>1)</sup>, mais c'est une matière première qu'il est facile de se procurer dans un état de pureté très grand, c'est-à-dire avec des propriétés très constantes, et sous une forme très finement divisée.

Ce dernier point a une certaine importance au point de vue des manipulations: une division fine est indispensable pour l'obtention d'une suspension parfaitement homogène du produit dans le dissolvant choisi, homogénéité nécessaire pour une dissolution rapide. Quant au choix du dissolvant, il s'est porté sur l'acétamide à cause de sa parfaite stabilité; aux températures nécessaires pour obtenir une dissolution, la formamide commence déjà à se décomposer un peu; et l'urée, malgré son pouvoir dispersif considérable, subit, dès qu'on a dépassé son point de fusion, au cours d'une chauffe à 140° prolongée par exemple une demi-heure, une décomposition que le dégagement d'ammoniac dénonce très nettement. L'emploi de ces deux dissolvants aurait pu entraîner une ammoniacolyse du protide.

## II. TECHNIQUE DE LA DÉSAGRÉGATION.

### a) *Produits originels.*

L'acétamide du commerce est un produit assez impur, à réaction acide, et souillé de corps qui lui confèrent son odeur désagréable

<sup>1)</sup> Voir p. ex., K. Linderström-Lang, Compt. rend. Lab. Carlsberg 17, 1 (1929).

habituelle. Il est essentiel de travailler avec un produit pur, exempt notamment d'humidité et d'acidité qui auraient pu entraîner l'une et l'autre des transformations profondes des protides aux températures mises en œuvre. Nous avons eu recours d'abord à la recristallisation à laquelle l'acétone se prête très bien comme dissolvant. Mais cette opération ne conduit pas toujours à un produit neutre et sec, d'autant plus que l'acétamide est assez hygroscopique et qu'elle reprend très facilement de l'humidité lors des manipulations de filtration et de lavage des cristaux. La méthode la plus pratique consiste à distiller 2 ou 3 fois dans le vide le produit commercial recristallisé dans l'acétone ou au moins lavé à l'acétone. Le produit est distillé dans un ballon *Claisen*, dans le vide de la trompe à eau, par exemple à 120° sous 13 mm. de mercure. On rejette la première fraction; dès que la température des vapeurs est devenue constante, on change de récipient et reçoit le produit dans un second ballon *Claisen*, de manière à éviter tout transvasage. On arrête avant que la totalité du produit n'ait passé. La seconde distillation est conduite comme la première. Si le produit obtenu alors n'est pas tout à fait neutre (essai d'un fragment sur du papier tournesol), une troisième distillation conduira au résultat désiré. Si la première distillation d'une acétamide recristallisée dans de l'acétone et séchée dans le vide sur le chlorure de calcium est conduite très doucement, on obtient parfois un produit neutre à la première distillation. Il est indispensable d'éviter tout contact des vapeurs d'acétamide avec du caoutchouc; il faut employer des bouchons de liège ou protéger les bouchons en caoutchouc par des rondelles de liège. Le produit pur est conservé dans le ballon dans lequel il a été reçu.

Quant à la caséine, nous avons employé le produit commercial de caséine pure préparée selon *Hammarsten*, qui possède une composition et des propriétés très constantes. Le produit (des maisons *Kahlbaum* et *Hoffmann-La Roche*) a été séché à poids constant à 80° et conservé sur de l'anhydride phosphorique.

#### b) Désagrégation.

Dans un ballon à col large, on verse l'acétamide pure fondue (point de fusion: 83°). Le ballon, rempli tout au plus à moitié, est placé dans un bain d'huile chauffé à 100°—110°. On introduit alors la caséine par petites portions et en remuant constamment. On obtient ainsi une masse qui devient très rapidement visqueuse. Il est facile d'obtenir une suspension homogène de caséine dans l'acétamide dans la proportion de 1:5. Lorsque toute la caséine est introduite, on élève graduellement la température du bain en continuant l'agitation. Vers 150° (température du bain) la masse commence à devenir fluide et à se clarifier; à 160°—170° le mélange

est parfaitement liquide et transparent. À ce moment le mélange est encore neutre au tournesol. À 180°—190° commence un léger dégagement d'ammoniac, tandis que la solution devient acide; en même temps, la solution se colore peu à peu en brun. Lorsqu'on maintient la température à 200°, la coloration devient toujours plus foncée, tandis que le dégagement d'ammoniac cesse au bout de quelques minutes.

Pour retirer les produits de la réaction, on peut épuiser la masse solidifiée et concassée, à l'éther, au *Soxhlet*. L'acétamide est entraînée peu à peu, tandis que la caséine transformée ne se dissout pas du tout. Le poids du résidu est sensiblement égal à celui de la caséine mis en œuvre. Cette opération est cependant très longue (15 jours), de sorte que ce mode de faire ne saurait s'appliquer qu'à de petites quantités de substance.

On peut provoquer la précipitation d'une partie des produits en versant la masse fondue dans beaucoup d'acétone. Mais les produits de désagrégation, tout à fait insolubles dans l'acétone pure, s'y dissolvent assez facilement en présence d'acétamide, de sorte que leur précipitation est très incomplète. Nous avons eu recours alors à l'élimination préalable de la majeure partie de l'acétamide par distillation dans un vide très poussé. Sous une pression de 1 mm., on peut distiller l'acétamide dans un bain dont la température oscille entre 100° et 110°. Dans ces conditions, on en peut distiller 300 gr. en 2 à 3 heures. L'opération doit être faite dans un ballon à distiller spécial, dans lequel le tube d'abduction des vapeurs est remplacé par une saucisse de volume convenable. Par un refroidissement à l'eau courante, il faut avoir soin de condenser dans la saucisse toute l'acétamide qui passe, de manière à éviter une obstruction de la conduite de la trompe par sublimation de l'acétamide. On arrête l'opération quand le contenu du ballon est devenu complètement pâteux. On le verse alors dans un grand volume d'acétone sèche (1 litre pour le produit obtenu dans 100 gr. d'acétamide). Une partie des produits est précipitée à l'état de flocons, le reste se dépose au fond en une masse solide qui ne tarde pas à devenir friable au contact du dissolvant. On pulvérise sous l'acétone, on filtre, on lave à l'acétone et à l'éther, et on sèche immédiatement dans le vide. Le rendement est de 80 % à 90 % du poids de la caséine. La solution acétonique brun clair renferme encore des dérivés protéiques maintenus en solution par l'acétamide qui n'a pas été éliminée. On peut encore retirer de cette solution une certaine quantité de produits de transformation, par concentration et addition d'éther; le meilleur procédé consiste à répéter, sur le résidu de la distillation du dissolvant, l'élimination de l'acétamide dans le vide et le traitement avec l'acétone. Il faut avoir soin de sécher rapidement les produits obtenus, surtout

les dernières fractions, et de les garder à l'abri de l'humidité tant qu'ils ne sont pas entièrement débarrassés des dissolvants organiques, car tant que ces produits en contiennent encore, ils ont la tendance à se transformer, à l'air humide, en une pâte qui ne se dessèche que très lentement.

### III. ÉTUDE DES PRODUITS DE DÉSAGRÉGATION.

#### *a) Données qualitatives.*

On obtient de la sorte un produit légèrement coloré en jaune. Lorsqu'on a eu soin d'éliminer complètement les dissolvants à l'abri de l'humidité, il se présente sous la forme d'une poudre très peu hygroscopique; la couleur est fonction de la durée de chauffe et augmente avec cette dernière. Le produit est soluble en grande partie dans l'eau chaude; de nouveau, la solubilité augmente avec la durée du traitement à chaud. La solution aqueuse a une réaction acide au tournesol. L'alcool absolu en dissout une proportion d'autant plus considérable que la chauffe a été prolongée davantage. La solution obtenue à chaud laisse déposer par refroidissement une partie des substances dissoutes, sous forme d'une poudre qui renferme des grains d'apparence cristalline. La partie qui est restée en solution peut être récupérée par concentration et refroidissement, et finalement par précipitation par l'éther sec; en présence d'eau, la solubilité dans l'alcool est plus grande, mais il est plus difficile de retirer le produit autrement que sous forme d'une pâte durcissant très lentement dans le vide sec.

Les produits de désagrégation se dissolvent très facilement dans les alcalis dilués, et même dans de l'ammoniaque ou du carbonate dilués. Les acides minéraux dilués ne les dissolvent pas plus complètement que l'eau. Le produit se distingue ainsi de la caséine primitive; il présente cependant encore la plupart des réactions colorées des matières protéiques que donne la caséine; réaction xanthoprotéique, réaction du biuret, réaction au sulfure de plomb, réaction de *Millon*. Les produits ayant subi une chauffe à 200° dépassant 5 minutes ne donnent plus immédiatement la réaction du biuret; celle-ci réapparaît cependant après un repos de quelques heures en milieu alcalin; nous aurons du reste l'occasion de revenir sur cette particularité.

#### *b) Composition centésimale.*

Le premier examen qui s'impose consiste à vérifier s'il s'agit d'un produit qui résulte essentiellement d'une transposition moléculaire de la matière première, ou si l'on a affaire à un produit dû à une action chimique du véhicule. La composition centésimale de la caséine transformée se rapproche beaucoup de celle de la substance



primitive; la fraction principale des produits de désagrégation, celle qui est facilement soluble dans l'alcool à chaud, possède également à peu près la même composition. La teneur en azote y est un peu plus faible que dans la caséine, il n'y a donc pas eu rupture de chaînes par addition d'ammoniac (82,3 % N) ou d'acétamide (23,7 % N), rupture qui se trahirait par une augmentation de la teneur en azote. Ces constatations, jointes au fait que le rendement est pour ainsi dire quantitatif, permettent de considérer une intervention directe de la molécule du dissolvant comme très peu probable.

1° Subst. chauffée 15 minutes à 200°, débarrassée du dissolvant par extraction à l'éther; séché sur  $\text{CaCl}_2$ .

0,1476 gr. ont donné 0,2885 gr.  $\text{CO}_2$  et 0,1033 gr.  $\text{H}_2\text{O}$ .

0,4035 gr. ont neutralisé 41,8  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1-n. (*Kjeldahl*).

0,5465 gr. ont neutralisé 56,0  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1-n. (*Kjeldahl*).

2° Subst. chauffée de la même manière, précipitée par l'acétone; fraction soluble dans l'alcool bouillant, précipitée par refroidissement, séchée sur  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

0,1133 gr. ont donné 0,2227 gr.  $\text{CO}_2$  et 0,0740 gr.  $\text{H}_2\text{O}$ .

0,1790 gr. ont neutralisé 19,15  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1-n. (*Kjeldahl*).

Trouvé C 53,31; 53,61 H 7,83; 7,39 N 14,50; 14,05; 14,18%

Caséine „ 53,07 „ 7,13 „ 15,64%

### c) Répartition de l'azote.

Après l'hydrolyse, l'azote des protides se retrouve sous forme d'ammoniac et d'amino-acides. Il est essentiel d'étudier à ce point de vue le nouveau produit. A cet effet, nous avons déterminé la répartition de l'azote dans les produits d'hydrolyse d'une fraction déterminée des produits de désagrégation. Cette fraction avait des chances de représenter un mélange moins complexe que le produit brut. Les substances formant le produit de désagrégation ont des propriétés nettement acides, et forment des sels peu solubles avec les métaux lourds. En passant par les sels de cuivre, nous avons effectué un fractionnement, en procédant comme suit:

60 gr. de produit obtenu par une chauffe de 30 minutes à 200° sont traités par de l'alcool bouillant. La solution alcoolique, séparée du résidu insoluble, est additionnée d'une solution alcoolique d'acétate de cuivre, tant qu'il se produit un précipité. Le précipité vert-olive, environ 20 gr., est suspendu dans de l'alcool bouillant et traité par de l'hydrogène sulfuré à refus. La solution, séparée du sulfure de cuivre par filtration, est précipitée une seconde fois par l'acétate de cuivre alcoolique. Le second précipité, en suspension alcoolique, donne par traitement avec de l'hydrogène sulfuré une solution dont on retire environ 10 gr. de substance régénérée. C'est sur cette fraction que nous avons étudié la répartition de l'azote après l'hydrolyse; nous avons déterminé selon des procédés connus l'azote humique, ammoniacal, diaminé et monoaminé.

Par transformation en éthers acétylés distillables selon *Cherbuliez, Plattner et Ariel*<sup>1)</sup>, nous avons établi que l'azote «monoaminé», c'est-à-dire l'azote restant après élimination de l'ammoniac et précipitation des substances basiques par l'acide phosphotungstique, était bien de l'azote d'acides monoaminés.

1° 0,3690 gr. de subst. hydrolysé par de l'acide chlorhydrique à 12% au bain-marie (durée de chauffe: 120 heures) ont donné:

Azote humique (précipité magnésien obtenu après élimination de l'ammoniac par distillation avec MgO): neutralise 2,97 cm<sup>3</sup> acide 0,1-n. (*Kjeldahl*).

Azote ammoniacal (par distillation du produit d'hydrolyse avec MgO): neutralise 7,73 cm<sup>3</sup> acide 0,1-n.

Azote restant en solution: neutralise 29,60 cm<sup>3</sup> acide 0,1-n. (*Kjeldahl*).

2° 3,85 gr. de subst. hydrolysés comme sous 1°. La solution, débarrassée de l'ammoniac et des matières humiques, est précipitée par de l'acide phosphotungstique; l'azote est dosé dans le précipité par de l'acide phosphotungstique; l'azote est dosé dans le précipité (acides diaminés) et dans le filtrat (acides monoaminés). Le filtrat est étherifié et acétylé, les éthers acétylés sont distillés dans le vide, et l'azote du distillat (éthers acétylés des acides monoaminés) est dosé:

Azote diaminé:  $\frac{1}{10}$  du précipité neutralise 11, 48 cm<sup>3</sup> d'acide 0,1-n. (*Kjeldahl*).

Azote monoaminé:  $\frac{1}{10}$  de la solution neutralise 19,11 cm<sup>3</sup> d'acide 0,1-n. (*Kjeldahl*).

Ethers acétylés des acides monoaminés:  $\frac{7}{10}$  de la solution étherifiés et acétylés donnent un distillat qui passe de 95° à 180° sous 1 mm. de pression: poids du distillat: 1,8 gr.  $\frac{1}{5}$  du distillat neutralise 18,9 cm<sup>3</sup> acide 0,1-n. (*Kjeldahl*).

|   | Fraction de<br>cas. désagrégée | Caséine  |
|---|--------------------------------|----------|
| Azote total . . . . .   | 15,30                          | 15,30% N |
| Azote ammoniacal . . . . .  | 2,93                           | 0,16% „  |
| Azote humique . . . . .   | 1,12                           | 0,32% „  |
| Azote diaminé . . . . .   | 4,17                           | 3,75% „  |
| Azote monoaminé . . . . .   | 6,94                           | 10,00% „ |
| Rendement en éthers acétylés distillés<br>des acides monoaminés . . . . . | 71                             | 75%      |
| P. d'éb. des éthers acétylés sous 1 mm.                                   | 90—180°                        | 90—200°  |

A titre de comparaison, nous indiquons les données numériques obtenues avec la caséine. Ce tableau met en évidence le fait que la fraction examinée se distingue indiscutablement de la caséine au point de vue quantitatif. Mais il montre en même temps qu'au point de vue qualitatif il y a analogie parfaite entre les deux produits: le produit de désagrégation de la caséine se comporte, en ce qui concerne l'hydrolyse, tout à fait comme une matière protéique; c'est-à-dire qu'il donne par hydrolyse de l'ammoniac, des acides diaminés, et des acides monoaminés nombreux. La désagrégation dans l'acétamide n'est donc pas accompagnée d'une destruction complète et brutale de l'édifice moléculaire primitif.

<sup>1)</sup> Helv. 13, 1390 (1930).

Il ressort d'autre part de ce tableau que notre fractionnement est très peu efficace en ce qui concerne la séparation de substances relativement simples du mélange complexe que représente nécessairement le produit brut.

*d) Poids moléculaire des produits de désagrégation.*

Afin d'examiner ces produits au point de vue de leur poids moléculaire, nous avons commencé par préparer une série de substances en faisant varier la durée de la chauffe à 200°. Ces préparations ont été faites chaque fois avec 2 gr. de caséine suspendus dans 10 gr. d'acétamide; après la chauffe, le mélange encore liquide est versé directement dans un très fort excès d'acétone. La quantité très réduite d'acétamide permet d'employer un excès suffisant d'acétone pour obtenir ainsi en une seule opération, et avec un bon rendement, les produits de désagrégation.

Nous avons fait en outre un fractionnement par traitement à l'alcool. A cet effet, nous sommes partis de 15 gr. de produits obtenus par une chauffe de 30 minutes à 200°. Ces produits ont été traités pendant une heure à reflux avec 1 litre d'alcool absolu. La solution filtrée nous a donné par refroidissement une première fraction; par concentration de la liqueur-mère et refroidissement, on en obtient une seconde; et par addition d'éther aux dernières liqueurs-mères, on obtient une troisième fraction.

Nous numérotons ces préparations dans l'ordre suivant:

- I° Température portée à 200°.
- II° Température maintenue à 200° pendant 5 minutes.
- III° Température maintenue à 200° pendant 10 minutes.
- IV° Température maintenue à 200° pendant 20 minutes.
- V° Température maintenue à 200° pendant 40 minutes.
- VI° Température maintenue à 200° pendant 30 minutes, fraction sol. alcool à chaud.
- VII° Température maintenue à 200° pendant 30 minutes, fraction sol. alcool, précip. par concentration.
- VIII° Température maintenue à 200° pendant 30 minutes, fract. sol. alcool froid, pptée par addition d'éther.
- IX° Température maintenue à 200° pendant 30 minutes, fraction insoluble dans l'alcool.

Le poids moléculaire a été déterminé d'abord par cryoscopie. Comme dissolvant, l'acétamide est tout indiquée puisque tous ces produits y sont facilement solubles. Nous avons voulu faire aussi des déterminations ébullioscopiques dans de l'alcool avec les fractions VI, VII et VIII. Mais les produits VI et VII ne s'y redissolvent que lentement; ils ont tendance à se transformer en une masse compacte qui ne se dissout qu'après trituration. Comme cette manipulation n'est guère compatible avec les exigences d'une ébullioscopie, nous n'avons fait l'ébullioscopie dans l'alcool qu'avec la fraction VIII qui s'y dissout assez rapidement et complètement.

*Poids moléculaire des produits de désagrégation en solution dans l'acétamide.*

Les substances examinées ont été desséchées à poids constant dans le vide de la trompe à eau, à une température ne dépassant pas 80°; d'une façon générale, on obtient un poids constant après une chauffe de 2 à 3 jours. Les substances séchées ont été conservées dans un dessiccateur à anhydride phosphorique<sup>1)</sup>. Les mesures ont été faites avec les précautions que nous décrivons dans une note<sup>2)</sup> consacrée à la détermination de la constante cryoscopique de l'acétamide. Les valeurs pour K qu'on trouvera dans le tableau suivant sont tirées de cette note.

| Substance | Concentration<br>% poids | Conc. moléc.<br>% × 100 | $\Delta$ | K    | Poids moléc. |
|-----------|--------------------------|-------------------------|----------|------|--------------|
| I         | 1,32                     | 0,33                    | 0,170°   | 5100 | 396          |
| II        | 1,71                     | 0,44                    | 0,220°   | 4950 | 385          |
| III       | 0,93                     | 0,38                    | 0,190°   | 5050 | 247          |
| IV        | 1,59                     | 0,45                    | 0,225°   | 4950 | 350          |
| V         | 3,16                     | 0,99                    | 0,445°   | 4500 | 320          |
| IX        | 1,84                     | 0,72                    | 0,340°   | 4750 | 257          |

*Poids moléculaire de la fraction VIII dans l'alcool (K = 1150).*

| Concentration | $\Delta$ | Poids moléc. |
|---------------|----------|--------------|
| 3,06          | 0,095°   | 371          |
| 2,62          | 0,080°   | 377          |
| 3,78          | 0,070°   | 620          |

Un contrôle avec de l'acide hippurique dans de l'alcool a donné une valeur normale ( $c = 3,57\%$ ,  $\Delta = 0,240^\circ$ , poids moléc., trouvé 171 au lieu de 179).

Le poids moléculaire moyen des produits de désagrégation est de l'ordre de grandeur 350, indépendamment des conditions de préparation.

Les poids moléculaires sont tous du même ordre de grandeur. Les résultats obtenus dans l'alcool sont assez irréguliers, et nous n'avons pas multiplié les mesures faites dans ce dissolvant. Le fractionnement par l'alcool et la variation de la durée de chauffe (dans les limites de nos expériences), n'ont pas d'influence systé-

<sup>1)</sup> Nous avons procédé ainsi pour toutes les analyses mentionnées dans ce travail.

<sup>2)</sup> E. Cherbuliez et G. de Mandrot, « Note sur l'emploi de l'acétamide comme dissolvant pour la cryoscopie », à la suite de cet article, p. 183.

matique sur la grandeur moléculaire apparente des produits de désagrégation. A défaut de conclusions très précises, on peut dire en tout cas que l'action de la chaleur en présence d'acétamide se traduit par la transformation du protide primitif en un mélange complexe de substances dans lequel les fragments à petite molécule sont prédominants.

*e) Poids équivalents des produits de désagrégation.*

Ce qui donne du poids à cette conclusion, c'est qu'elle est confirmée par des déterminations de poids équivalents, faits soit par des dosages de cuivre dans des sels de ce métal, soit par titrage acidimétrique.

*Sels de cuivre.*

A titre d'exemple, citons quelques chiffres qui se rapportent à un essai de fractionnement des produits de désagrégation bruts par les sels de cuivre.

Les produits obtenus par une chauffe de 30 minutes à 200° sont suspendus dans 25 volumes d'alcool absolu et portés à l'ébullition. Presque tout se dissout. On filtre à chaud et on précipite la solution alcoolique par de l'acétate de cuivre en solution alcoolique bouillante jusqu'à ce que la quantité du précipité n'augmente plus. Après refroidissement, on sépare le précipité qui s'est formé à chaud et qui a encore augmenté par refroidissement:  $R_2Cu$ . On lave le précipité filtré en le suspendant trois fois dans de l'alcool absolu et en filtrant chaque fois après 24 heures de repos. Le précipité obtenu (rendement environ 50 % en poids de la quantité de substance mise en œuvre) est séché dans le vide à la température ordinaire.

1,0281 gr. de subst. ont donné, après destruction de la substance organique selon Carius, 0,0762 gr. Cu par électrolyse.

Trouvé Cu = 7,41%, équivalent: 432.

De ces sels, on régénère une substance acide par traitement avec de l'hydrogène sulfuré en suspension alcoolique, et on répète la précipitation par l'acétate de cuivre alcoolique:  $R_2Cu$ .

0,2109 gr. de ce nouveau sel ont donné 0,0240 gr. Cu.

Trouvé Cu 11,37%, équivalent 232.

La répétition des opérations décrites fournit un troisième produit:  $R_2''Cu$ .

0,1460 gr. de subst. ont donné 0,0192 gr. de Cu.

Trouvé Cu 13,15%, équivalent 243.

Le premier précipité  $R_2Cu$  (équivalent 432), épuisé par de l'alcool bouillant, laisse 40 % d'un résidu très peu soluble:  $R_2^aCu$ .

0,3140 gr. de cette substance ont donné 0,0329 gr. Cu.

Trouvé Cu 10,48%, équivalent 305.

Toutes ces fractions sont du reste très loin d'être homogènes. Le dosage du soufre et du phosphore montre que leur teneur en ces éléments est variable d'un produit à l'autre, mais toujours assez faible: comme le poids moléculaire moyen de nos fractions est petit, ces teneurs faibles en soufre et en phosphore doivent résulter de leur non-homogénéité.

$R_2Cu$ : 0,3505 gr. subst. ont donné 0,0192 gr.  $BaSO_4$ .  
 0,4316 gr. subst. ont donné 0,0230 gr.  $BaSO_4$ .  
 0,2767 gr. subst. ont donné 0,2125 gr. phosphomolybdate (d'après Woy).  
 $R_2'Cu$ : 0,1660 gr. subst. ont donné 0,1226 gr. phosphomolybdate.  
 $R_2''Cu$ : 0,1460 gr. subst. ont donné 0,0240 gr. phosphomolybdate.  
 $R_2^aCu$ : 0,3109 gr. subst. ont donné 0,0187 gr.  $BaSO_4$ .  
 0,3115 gr. subst. ont donné 0,0180 gr.  $BaSO_4$ .  
 0,2525 gr. subst. ont donné 0,3020 gr. phosphomolybdate.

Comme on connaît la teneur en cuivre de toutes ces fractions (voir les chiffres indiqués plus haut), on peut calculer les teneurs en soufre et phosphore pour les substances primitives dont on a analysé les sels. Pour le produit le moins fractionné,  $RH$ , ces teneurs se rapprochent beaucoup de celles qu'on trouve pour le produit originel, la caséine.

|   | $RH$       | $R'H$ | $R''H$ | $RaH$      |
|---|------------|-------|--------|------------|
| S | 0,77; 0,75 | —     | —      | 0,91; 0,88 |
| P | 1,30       | 1,49  | 0,38   | 2,18%      |

### *Titrages acidimétriques.*

Les produits de désagréation se dissolvent très facilement dans des solutions diluées d'ammoniaque ou de carbonates alcalins: leurs propriétés nettement acides nous ont engagés à faire des titrages acidimétriques en présence de phénolphtaléine.

Nous avons procédé par dissolution d'une quantité donnée de substance dans 15 cm<sup>3</sup> d'eau distillée bouillie additionnée de 5 cm<sup>3</sup> de soude caustique 0,1-n. (on active cette dissolution en écrasant avec une baguette les grumeaux qui ont toujours tendance à se former). La solution brune est ensuite neutralisée par de l'acide chlorhydrique 0,1-n. en présence de phénolphtaléine. Il est indiqué de ne pas dépasser les concentrations indiquées, pour éviter que la coloration brune des substances ne masque le virage de l'indicateur.

De nouveau, les différentes préparations se comportent toutes à peu près de la même manière: les poids équivalents sont du même ordre de grandeur, ils vont faiblement en diminuant avec la durée de chauffe dans l'acétamide. Ils sont à peu près le double des poids

moléculaires que présentent les mêmes fractions dissoutes dans de l'acétamide. Le fractionnement selon la solubilité dans l'alcool ne se traduit pas non plus par une modification du poids équivalent.

| Préparation | Poids dissous<br>gr. | Acidité<br>cm <sup>3</sup> 0,1-n. | Equivalent |
|-------------|----------------------|-----------------------------------|------------|
| I           | 0,1628               | 1,97                              | 825        |
| II          | 0,1189               | 1,62                              | 735        |
| III         | 0,0898               | 1,27                              | 705        |
| IV          | 0,0892               | 1,32                              | 675        |
| V           | 0,0569               | 0,87                              | 650        |
| VI          | 0,0858               | 1,02                              | 840        |
| VII         | 0,1448               | 1,77                              | 815        |
| VIII        | 0,0953               | 1,12                              | 850        |

*f) Titrage au formol; polymérisation spontanée.*

Le dosage des fonctions amino libres dans les molécules complexes des protides se fait par la méthode très élégante du titrage au formol de *Soerensen*. Nous avons été assez surpris en constatant que le titrage au formol des préparations I à VIII a donné un résultat tout à fait négatif; lorsqu'on ramène la nuance des solutions neutralisées au brun-rose, par addition de quelques gouttes de soude 0,1-n. (le brun-jaune des solutions primitives se superposant au rouge de la phénolphtaléine), et qu'on ajoute, selon la technique de *Soerensen*, du formol neutralisé, il ne se produit aucun changement de nuance. L'apparition de fonctions acides dans nos produits de désagrégation ne s'accompagne donc pas de production simultanée de fonctions amino primaires ou secondaires libres.

Mais lorsqu'on laisse reposer les solutions additionnées de formol pendant 12 heures, on constate que la phénolphtaléine est décolorée (la solution est redevenue brune ou jaune). Il faut une addition de quelques gouttes de soude 0,1-n. pour ramener la solution à la nuance primitive. Un nouveau repos de 12 heures se traduit par une nouvelle décoloration, compensée par une nouvelle addition de quelques gouttes de soude. Il se fait donc au sein de la solution aqueuse une transformation qui se traduit par l'apparition graduelle d'une faible quantité d'azote titrable au formol.

On pensera tout d'abord, pour expliquer ces constatations, à un phénomène d'hydrolyse, mais des observations quantitatives et qualitatives nous font conclure au contraire à une polymérisation. Voici de quoi il s'agit:

Nous avons dit plus haut que les produits de désagrégation de la caséine ne donnaient plus immédiatement la réaction du biuret dès que la durée de chauffe dépassait 5 minutes; par contre, les

produits obtenus après une chauffe plus brève la donnent encore immédiatement. Mais si on conserve les solutions alcalines additionnées de sulfate de cuivre, telles qu'on les prépare pour la réaction du biuret, on remarque que la coloration caractéristique violacée apparaît peu à peu au repos, même dans le cas des fractions chauffées par exemple 40 minutes à 200°.

Cette apparition graduelle de la réaction du biuret est uniquement due au séjour de nos produits en milieu alcalin. Pour le montrer, il suffit de dissoudre 0,1 gr. environ d'une de nos préparations dans 15 cm<sup>3</sup> d'eau additionnée de 5 cm<sup>3</sup> de soude caustique 0,1-n. En prélevant des prises de 3 ou 4 cm<sup>3</sup> de cette solution après écoulement de laps de temps variables, et en additionnant ces prises de trois gouttes de soude caustique concentrée et d'une goutte de solution de sulfate de cuivre, on constate que l'apparition de la coloration violette est d'autant plus rapide, pour une préparation donnée, que la durée de l'action de l'alcali dilué a été plus longue. Plus la durée de chauffe lors de la transformation de la caséine a été longue, plus le temps nécessaire pour obtenir une réaction rapide est long. L'intensité de la réaction suit du reste une marche analogue.

Le tableau suivant expliquera d'une façon plus complète nos observations. Les réactions ont été faites avec des solutions préparées comme nous venons de l'indiquer, après des laps de temps de repos variables. Les croix indiquent l'intensité de la réaction, trois croix signifiant une réaction d'une intensité comparable à celle que donne la caséine à la même concentration. Les nombres de minutes placés entre parenthèses se rapportent au temps qui s'écoule entre l'addition des trois gouttes de soude et de la goutte de solution de sulfate de cuivre et l'apparition de la coloration. L'absence d'indication de ce genre signifie une réaction immédiate.

| Préparation | Réaction effectuée:         |                     |                    |                     |
|-------------|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
|             | immédiatement après dissol. | 1½ h. après dissol. | 3 h. après dissol. | 15 h. après dissol. |
| I           | +++                         | +++                 | +++                | +++                 |
| II          | (2 min.) ++                 | ++                  | ++                 | +++                 |
| III         | (4 min.) +                  | (2 min.) +          | (1 min.) +         | (½ min.) ++         |

Dans le cas des réactions effectuées immédiatement après dissolution, en laissant reposer les solutions obtenues pendant une heure, on constate que l'intensité de II devient égale à celle de I, tandis que III, tout en augmentant d'intensité, reste encore légèrement plus pâle, même après trois heures de repos. Par contre, 5 minutes après avoir effectué la série des «15 heures après dissolution», nous



constatons que les trois éprouvettes présentent la même intensité de coloration.

Du moment que la disparition de la réaction du biuret est due au prolongement de la durée de chauffe dans l'acétamide, on est porté à croire qu'elle correspond à une altération de plus en plus profonde de la molécule primitive: la réapparition de cette réaction après un séjour en milieu alcalin se présente donc comme un phénomène de *rétrogradation*, qui serait dû à l'action de ce milieu alcalin.

Pour confirmer cette manière de voir, nous avons dissous nos produits dans de la soude diluée, et nous avons fait le titrage de leur acidité après un repos de durée variable en milieu alcalin. Nous avons constaté que, dans ces conditions, l'équivalent acide augmentait dans des proportions considérables. Cette augmentation est plus marquée avec les préparations ayant subi une chauffe modérée dans l'acétamide, qu'avec celles qui ont été chauffées plus longtemps. D'autre part, elle est d'autant plus accentuée que la concentration en produit est plus élevée, les conditions d'alcalinité restant les mêmes.

Pour obtenir les données numériques qu'on va lire, nous avons procédé comme suit. La substance (0,1 gr. environ, ou moins) est dissoute aussi rapidement que possible dans 15 cm<sup>3</sup> d'eau bouillie additionnés de 5 cm<sup>3</sup> de soude 0,1-n. On titre immédiatement l'excès de soude, et on détermine ainsi l'équivalent acide. On ajoute alors à cette solution, qui est neutre, 5 nouveaux cm<sup>3</sup> de soude, et on laisse s'écouler une heure. On titre ensuite une seconde fois. Dans quelques cas nous avons ajouté alors une nouvelle quantité de 5 cm<sup>3</sup> de soude, pour titrer la solution une troisième fois après un repos supplémentaire d'une heure.

| Préparation |           | Acidité cm <sup>3</sup> NaOH 0,1-n. |            |            | Equivalents trouvés |            |            | Rapport des équivalents après 1 h. et immédiatement |
|-------------|-----------|-------------------------------------|------------|------------|---------------------|------------|------------|---|
| No.         | poids gr. | immédiatement                       | après 1 h. | après 2 h. | immédiatement       | après 1 h. | après 2 h. |   |
| I           | 0,0232    | 0,35                                | 0,10       | <0,05      | 665                 | 2320       | > 5000     | 3,5   |
|             | 0,0526    | 0,65                                | 0,05       | <0,05      | 810                 | 10500      | > 10500    | 13  |
| II          | 0,0436    | 0,55                                | 0,10       | ~0,05      | 790                 | 4360       | > 8000     | 5,5   |
| III         | 0,0354    | 0,50                                | 0,20       | 0,10       | 710                 | 1770       | 3500       | 2,5   |
| IV          | 0,0449    | 0,62                                | 0,25       | 0,22       | 725                 | 1800       | 2050       | 2,5   |
| V           | 0,0190    | 0,25                                | 0,15       | non        | 760                 | 1270       |            | 1,7   |
|             | 0,0450    | 0,55                                | 0,25       | déterminé. | 820                 | 1800       |            | 2,2   |
| VII         | 0,0235    | 0,32                                | 0,17       | 0,12       | 735                 | 1380       | 1950       | 1,9   |
|             | 0,0413    | 0,50                                | 0,20       | 0,10       | 825                 | 2060       | 4130       | 2,5   |

Cette diminution du pouvoir neutralisant que nous venons de mettre en évidence est due à l'action du milieu alcalin. En solution neutre il n'y a pas de changement appréciable de l'équivalent acide. Une solution neutralisée de l'une quelconque de nos préparations, conservée telle, vire au rose par addition d'une seule goutte de soude 0,1-n., même après un repos de plusieurs heures; donc elle est restée neutre.

La diminution du pouvoir neutralisant va de pair avec la réapparition de la réaction du biuret, du moins chez les préparations qui ne donnent pas immédiatement cette dernière.

Le fait que les phénomènes décrits se produisent en milieu alcalin fait penser à une hydrolyse. La diminution de l'équivalent acide d'autre part suggère une polymérisation. Nous allons montrer que l'interprétation la plus simple qu'on puisse donner de ces deux phénomènes consiste à admettre que les produits de désagrégation de la caséine sont susceptibles de *se polymériser sous l'influence des ions hydroxyle*. En effet, admettons un instant que la soude caustique diluée de nos expériences ait provoqué uniquement une hydrolyse. Cela expliquerait aisément l'apparition d'une certaine quantité d'azote titrable au formol. Mais deux objections se présentent alors à l'esprit:

1° Une désagrégation hydrolytique s'accompagne généralement de la disparition ou d'un affaiblissement de la réaction du biuret, et non de son apparition. Nous savons bien qu'il pourrait y avoir rupture d'anhydrides cycliques de deux (dicéto-pipérazines) ou d'un plus grand nombre d'amino-acides, avec production de polypeptides donnant la réaction du biuret. Mais ce qui parle contre cette possibilité, c'est d'abord le poids moléculaire relativement faible des produits de désagrégation; et c'est ensuite le fait que les polypeptides ne donnent la réaction du biuret que lorsqu'ils renferment les restes d'au moins trois amino-acides, et qu'ils la donnent toujours faiblement.

C'est finalement le fait que la préparation I, chauffée le moins longtemps dans l'acétamide, donne directement une forte réaction du biuret, sans pour cela contenir de l'azote titrable au formol, pas plus que les préparations chauffées plus longtemps. La réaction du biuret n'est donc pas liée à la présence de fonctions amino libres dans nos produits de désagrégation. La ressemblance qui existe entre toutes nos préparations permet d'assigner les mêmes causes à leurs réactions communes.

Dans le phénomène de la réapparition de la réaction du biuret, il n'y a donc pas de motif de penser à l'hydrolyse puisque cette dernière n'intervient sûrement pas pour quelques-uns des produits de désagrégation.

2° Si la soude caustique provoquait une hydrolyse avec scission du lien peptique, il se produirait des groupes amino basiques en nombre égal à celui des fonctions carboxyle mises en liberté: l'équivalent acide déterminé toujours avec le même indicateur, c'est-à-dire au même  $p_H$  final, n'aurait pas eu de raisons de varier dans une mesure aussi considérable. Enfin, s'il y avait hydrolyse, celle-ci serait d'autant plus rapide qu'une même quantité de soude caustique agirait sur une plus faible quantité de substance; or on constate exactement le contraire (voir les déterminations de la variation de l'équivalent acide, préparations I, V et VII).

Pour ces raisons, l'hypothèse de la polymérisation nous semble actuellement la plus satisfaisante. Il va de soi que ces conclusions demandent à être confirmées. Les expériences relatées sont encore très incomplètes; toutes nos données quantitatives ont été obtenues à la même alcalinité, à un  $p_H$  entre 12 et 13; l'influence de la variation de l'alcalinité sur cette polymérisation n'a pas été étudiée, et les produits de transformation «polymérisés» en milieu alcalin n'ont pas été isolés.

L'hypothèse d'une polymérisation de substances hydrolysables survenue sous l'influence d'un milieu alcalin peut paraître très hardie. Elle n'est cependant pas tout à fait en opposition avec les faits connus. Nous rappellerons par exemple la constatation très intéressante faite par *E. Hofmann*<sup>1)</sup> lors de l'étude de la stabilité de l'acétyl-choline en solution aqueuse. Cet auteur a montré que la vitesse de l'hydrolyse de l'acétyl-choline en solution aqueuse passait par un minimum en fonction du  $p_H$ , ce qui était à prévoir, mais que ce minimum ne coïncidait nullement avec la neutralité absolue mais au contraire avec une acidité déjà nettement marquée: le  $p_H = 4$ . Il n'est donc pas impossible que des corps susceptibles d'être hydrolysés aient une tendance à la polymérisation passant par un maximum à réaction alcaline.

#### *g) Interprétation des résultats.*

Il va de soi que nous avons tenté de nous faire une idée des réactions qui ont lieu d'abord lors de la désagrégation étudiée de la caséine, ensuite dans la rétrogradation observée.

La transformation que subit la caséine est très profonde: même après une chauffe peu prolongée, on obtient des substances de propriétés très différentes de celles du produit de départ. Les données des analyses écartent la possibilité d'une intervention du dissolvant dans cette transformation. D'autre part il n'y a pas de passage graduel entre la caséine et ses produits de désagrégation. Nous

<sup>1)</sup> Helv. 13, 138 (1930).

considérons dès lors comme très peu probable la supposition qu'il s'agit d'une simple dépolymérisation d'un agrégat complexe formé grâce au jeu de valences ou d'affinités résiduelles de corps relativement simples. Nous pensons que les molécules primitives, possédant probablement des chaînes peptiques assez longues, subissent sous l'influence de la chaleur, en solution dans de l'acétamide, une dislocation: il y a rupture des chaînes et transformations des chaînes ouvertes en cycles relativement petits (poids moléculaires, poids équivalents). Ainsi, la dislocation des grandes molécules se fait sans changement de leur composition globale, et sans que les groupements atomiques de radicaux d'acides-amino qui concourent à la constitution du corps primitif soient détruites; l'hydrolyse des produits de désagrégation fournit toujours un mélange d'acides-amino. Au cours de la chauffe, il y a des transpositions intramoléculaires, comme on les connaît dans d'autres groupes de corps à poids moléculaire élevé. Si les scléroprotéines sont peu aptes à donner lieu à cette transformation, c'est que probablement leurs molécules, inertes, sont formées non de chaînes ouvertes, mais surtout de chaînes déjà fermées.

Lors de la rétrogradation, les cycles formés au cours de la première chauffe se transforment en s'agrandissant par polymérisation. Cette transformation est favorisée par un milieu alcalin qui tend à rompre les petits cycles, faciles à hydrolyser, et qui permet la formation de chaînes cycliques plus grandes et plus stables.

#### IV. RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1<sup>o</sup> De nombreux protides sont désagrégés par une chauffe en présence d'amides (urée, acétamide). Ces amides sont de bons dissolvants des dicéto-pipérazines. Les scléroprotéines se montrent particulièrement réfractaires à ce traitement; ce comportement ne parle pas en faveur de l'hypothèse d'après laquelle précisément certains représentants des scléroprotéines seraient à considérer comme constitués essentiellement de dicéto-pipérazines associées.

2<sup>o</sup> L'étude des produits de désagrégation de la caséine obtenus par une chauffe dans de l'acétamide montre que ces produits sont formés sans intervention du dissolvant; leur mélange possède la composition globale de la caséine. Par hydrolyse, on obtient un mélange d'acides-amino comme lorsqu'on hydrolyse de la caséine. Leurs propriétés sont cependant très différentes de celles de la caséine primitive: il s'agit de corps ayant pris naissance à partir des molécules primitives, très grandes, par une dislocation due à l'action de la chaleur, dislocation qui a cependant ménagé les groupements atomiques correspondant aux restes d'acides-amino. Cette désagrégation de la caséine par la chaleur peut être mise en

parallèle avec celle que l'on peut faire subir par exemple aux hydrates de carbone polymérisés. Elle ne permet pas de tirer des conclusions quant à la structure des molécules primitives, mais elle permet de considérer comme très probable que ces molécules primitives étaient très grandes.

3° En milieu alcalin, ces produits de désagrégation subissent une rétrogradation qui est due probablement à un phénomène de polymérisation.

Laboratoire de Chimie organique de l'Université, Genève.

---

### Note sur l'emploi de l'acétamide comme dissolvant pour la cryoscopie

par E. Cherbuliez et G. de Mandrot.

(22. XII. 30.)

Au cours de l'étude de certains produits de désagrégation de la caséine<sup>1)</sup>, nous avons eu recours à l'acétamide comme dissolvant cryoscopique.

A notre connaissance, ce corps n'a été employé que très rarement à cet effet.

G. Bruni et A. Trovanelli<sup>2)</sup> s'en sont servis pour l'étude de quelques sels inorganiques en solution non aqueuse, de même que Bruni et A. Manuelli<sup>3)</sup>. Les premiers ont déterminé la constante cryoscopique de l'acétamide avec trois substances organiques différentes, l'uréthane, le naphtalène et le diphényle. Les valeurs données par chacune de ces substances sont très constantes, mais concordent assez mal entre elles:  $K = 3630$  (uréthane),  $3330$  (naphtalène),  $3740$  (diphényle). Cela représente un écart de 12% entre les divers résultats, différence dépassant de beaucoup l'écart que présentent les déterminations faites avec la même substance, concordant entre elles à au moins 2% près. Bruni et Manuelli ont constaté d'autre part que des sels tels que l'iodure de potassium sont très fortement dissociés par ce dissolvant.

Les écarts des déterminations de  $K$  avec diverses substances sont si considérables qu'une nouvelle détermination de cette constante ne semble pas inutile. Pour la faire, nous avons choisi des corps présentant dans leur molécule des groupements atomiques dont

---

<sup>1)</sup> Voir l'article précédent: E. Cherbuliez et G. de Mandrot, Sur la désagrégation des protides par les amides etc., Helv. **14**, 163 (1931).

<sup>2)</sup> G. **34**, II, 349 (1904).

<sup>3)</sup> G. **35**, I, 448 (1905).