

Institut Espagnol de Physiologie et Biochimie
Agrégation de Chimie Enzymologique à Barcelone
Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique, Barcelona (Espagne)

Recherche de groupements actifs des protéines et leur application à l'étude de la protidémie plasmatique dans les leucoses lymphoïdes et myeloïdes *

par
J. Monche

(Recibido para publicar el 10 de octubre de 1958)

Dans une publication antérieure (8), nous avons donné une méthode de mesure de la réactivité des fonctions amino-terminales des protides, sur la base des techniques de la cinétique chimique, en utilisant comme réactifs les chlorures de diazonium de l'*alpha*-aminoanthraquinone et de l'acide anthranilique. Nous avons exprimé les résultats obtenus, au moyen d'indices de copulation et d'inactivation, en fonction du temps et de la densité optique correspondante. Ils sont en rapport avec les particularités de structure des aminoacides étudiés, ainsi qu'avec la concentration des groupements aminés, protéiniques ou protidiques, lorsqu'il s'agit de mélanges de différent protides.

Nos indices d'inactivations sont obtenus dans tous les cas en dénaturant préalablement par formolation, le produit biologique à l'étude ; ou bien, en plus, dans quelques cas, et d'une façon indépendante, par chauffage, lorsqu'il s'agit de protéines ou de mélanges qui les contiennent.

* Communication to the 4th International Congress of Biochemistry, Wien, September, 1958.

A titre d'exemple des possibilités de notre méthode, nous l'avons alors appliqué à l'étude de la leucémie lymphoïde humaine et de la lymphomatose aviaire, et constaté l'existence d'une hyperprotidémie très accusée dans tous les cas.

Dans ce Mémoire, nous l'avons appliqué à l'étude de la leucémie myeloïde humaine. Les valeurs basses de nos indices de copulation et d'inactivation, lorsque le processus morbide est très développé, contrastent avec les valeurs très élevées des indices de copulation que nous avons obtenu pour le plasma dans le cas des différents leucocytes lymphoïdes étudiées (8).

Ces valeurs basses, seraient indépendantes de l'existence, dans les leucocytes myeloïdes, d'un taux élevé de quelques protéines plasmatiques, car ce qui compte c'est la concentration des groupements aminés de tous les protides plasmatiques présents dans le système, copulables avec le sel de diazonium.

Les méthodes d'analyse courantes, ne nous fournissent des données numériques sur l'activité des fonctions N-terminales des aminoacides et des chaînes peptidiques des polypeptides et des protéines. Et justement la mesure de cette activité est très importante, car elle serait en rapport avec leur spécificité biologique (9).

Nous avons étudié l'influence de la bilirubine et constaté qu'elle fournit des valeurs négatives des indices d'inactivation correspondants, ce qui montre une augmentation de la réactivité de la bilirubine formolée, par rapport à la bilirubine pure. C'est donc à cette augmentation de la réactivité de la bilirubine formolée, que nous attribuons les bas indices d'inactivation du plasma, observés dans les leucocytes lymphoïdes, chez les sujets adultes (8), ainsi que dans les leucémies myeloïdes très développées.

Nous avons étudié l'action de l'acétone sur la bilirubine et sur les complexes protéine-bilirubine. L'acétone pure et la bilirubine, sont solubles en toutes proportions. Nous avons constaté qu'en présence de faibles quantités d'acétone, la bilirubine fournit des réactions «directes» très sensibles dans tous les cas, même avec le réactif d' EHRlich.

En présence d'alcool, la réactivité de la bilirubine est en rapport de la constitution chimique du sel de diazonium employé.

L'addition de plasma à une solution aqueuse de bilirubinate de sodium, entraîne une diminution considérable des indices de copulation correspondants. Nous interprétons ce fait comme obéissant à la formation d'un complexe pigment-protéine, et

montre que la liaison chimique est précisément établie, au moyen des fonctions amino-terminales des chaînes peptidiques des protéines plasmatiques, ce qui entraîne le blocage de ces fonctions et comme suite les bas indices de copulation obtenus.

Pour les indices d'inactivation correspondants nous avons obtenu des valeurs négatives, ce qui montre que sous l'action du formol ces complexes pigment-protéine sont décomposés et la bilirubine libérée comme suite, est rendue plus réactive sous l'action du formol.

L'addition de lipides plasmatiques aux complexes sérum-bilirubine, n'entraîne comme suite des modifications remarquables de nos indices de copulations et d'inactivation par formolation. Ceci peut être interprété, en notre opinion, comme obéissant au fait d'un affaiblissement des liaisons pigment-protéine sous l'action des lipides.

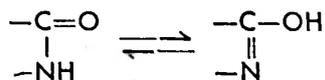
Les lipides, ainsi que le cholestérol et dérivés, dans les mélanges complexes biologiques, sont des inhibiteurs de la dénaturation protéique par chauffage, dans les conditions de nos expériences. Ce phénomène nous l'avons déjà expliqué, dans le cas d'autres agents antidénaturants différents (8).

Comme suite à nos résultats expérimentaux, nous attribuons à la bilirubine une structure saline intramoléculaire, sous formes *lactime-lactame*, en équilibre (voir Fig. 1).

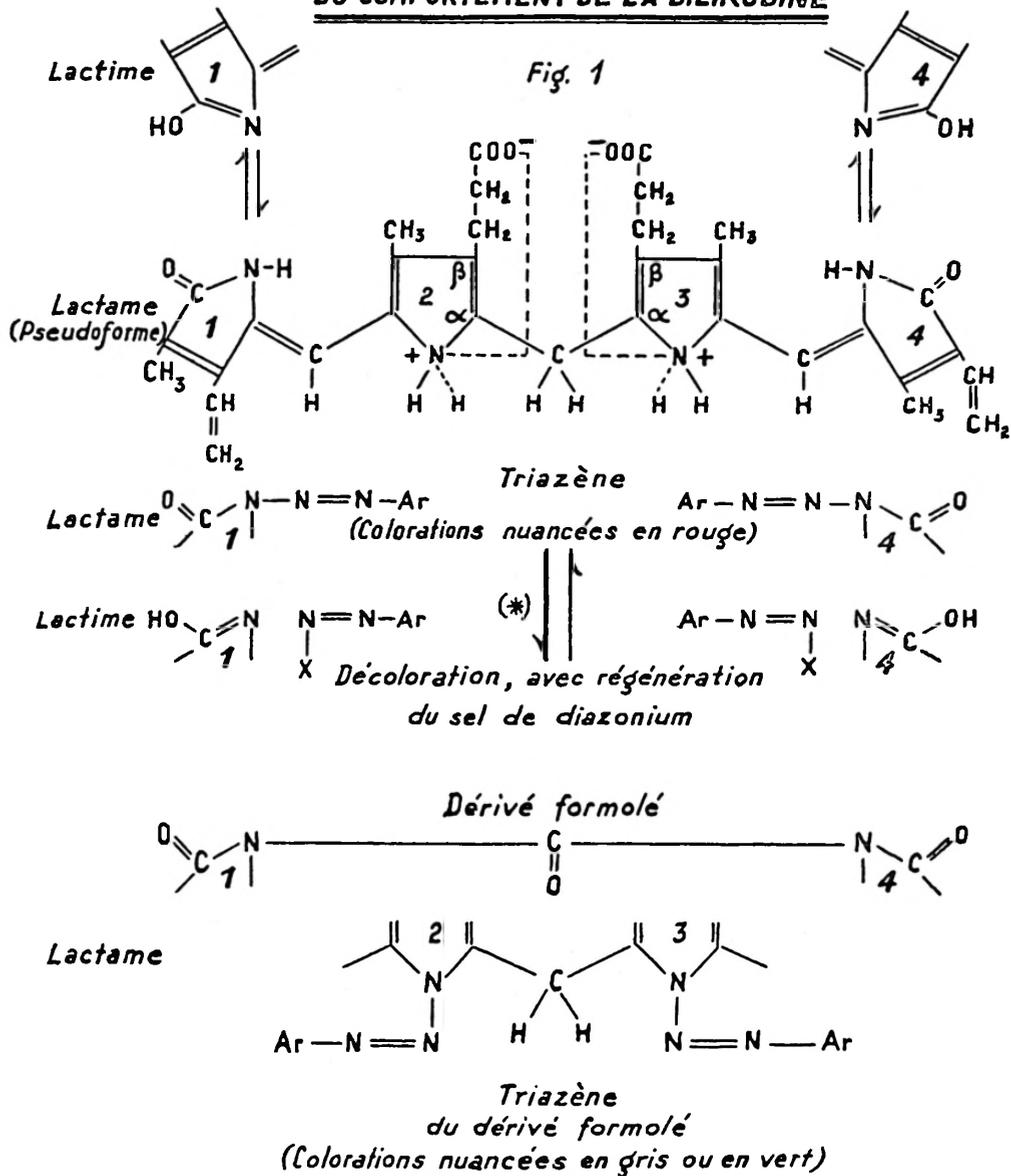
Les résultats que nous avons obtenu, permettent d'envisager la possibilité que les diazo-réactions étudiées, conduisent directement, dans les milieux faiblement acides ou alcalins, à la formation des triazènes fortement colorés correspondants.

Cette considération, ainsi que la possibilité de formolation de la bilirubine, nous obligent à une revision de la constitution chimique généralement adoptée pour ce pigment. Dans ce but, il faut tenir compte, à notre avis, de l'influence du caractère électrique des substituants V, vinyliques, et P, propionyliques, ainsi que de l'effet de l'enchaînement spécial tetrapyrrolique et des restants substituants en positions *alpha* et *beta*, occupées dans tous les noyaux, comme particularités structurales très importantes de la molécule de la bilirubine, susceptibles de diminuer considérablement le caractère «aromatique» de chaque noyau, mais plus spécialement des noyaux 2 et 3.

Dans les noyaux 1 et 4, est à remarquer l'existence de la triade de LAAR (11), sous formes lactame-lactime :



**INTERPRÉTATION STRUCTURELLE
DU COMPORTEMENT DE LA BILIRUBINE**



REMARQUE. - Dans les milieux fortement acides ou alcalins l'équilibre (*) est déplacé dans le sens LACTIME et la chaîne latérale en α du noyau 2 est substituée par le reste diazoïque, ce qui entraîne la scission de la chaîne, par tant, de la molécule de la bilirubine, conduisant à la formation du colorant azoïque correspondant, selon le processus largement décrit dans la bibliographie (nous lui attribuons les colorations bleues observées).

Selon BIRCH et SMITH (4), il est très probable que tous les pigments biliars possèdent une structure *lactame*.

Nous avons modifié la structure linéaire proposée par LEMBERG (6), tenant compte de l'équilibre *lactime-lactame* indiqué par LEMBERG et LEGGE (7), dans le sens d'admettre une salification intramoléculaire dans les noyaux 2 et 3.

Cette salification interne est concordante avec les travaux de ROBINSON (12). Cet auteur a mis en évidence depuis longtemps, le fait que les positions *beta* pyrroliques sont analogues aux positions *ortho* de l'aniline, tandis que les positions *alpha* sont analogues aux positions *para*.

La salification intramoléculaire que nous venons d'indiquer, empêcherait les diazoréactions conduisant à la formation de triazènes dans les atomes d'azote des noyaux 2 et 3, ayant perdu, comme suite, leur caractère iminique.

Par contre, dans les milieux fortement acides ou alcalins, le triazène de la Fig. 1 se décomposerait, en régénérant le sel ou l'hydroxyde de diazonium correspondant, selon la propriété normale, bien connue, de tous les triazènes (3). Au même temps, le sel interne des noyaux 2 et 3 serait décomposée, avec scission de la chaîne tetrapyrrolique, sous l'action du sel de diazonium, et formation du colorant azoïque, nuancé en bleu, correspondant, dont la constitution chimique est largement diffusée dans la littérature.

La formolation de la bilirubine, toujours partielle, comme suite à l'équilibre *lactime-lactame*, conduirait à une structure moins polaire, ce qui rendrait partant très labiles les liaisons salines intramoléculaires des noyaux 2 et 3. Les atomes d'azote respectifs seraient alors en conditions de récupérer leur fonction iminique et de fournir les triazènes correspondants avec les sels de diazonium, dans les milieux faiblement acides ou alcalins (diazoréactions de colorations nuancées en vert ou en gris-rougeâtre).

Naturellement, toutes les nuances indiquées se rapportent à celles fournies par les sels de diazonium que nous avons utilisés pour cette étude.

Comme le montrent nos résultats expérimentaux, les groupements iminiques de la bilirubine sont très réactifs, en accord avec leur caractère basique très accru, en notre opinion, comme suite à l'influence des particularités structurelles indiquées plus haut.

Et cette structure de sel interne, que nous attribuons à la bilirubine, serait présente, même dans les solutions de bilirubinate de sodium, comme suite à la forte hydrolyse de ce sel.

Elle permet en plus d'interpréter, surtout sous sa forme

lactame, sa solubilité dans les solvants non hydroxylés, tel que le chloroforme, éther éthylique et acétone. La salification intramoléculaire, conduit à une structure moins polaire de la bilirubine et c'est donc comme suite à l'influence de la nature du solvant, partant de la composition du milieu, sur l'équilibre *lactime-lactame*, que la réactivité de la bilirubine, sous sa forme active *lactame*, résulte plus favorisée.

Récemment, BILLING, COLE et LATHE (1), ont arrivé à la conclusion que les réactions directes des sérums bilirubiniques, ne sont pas fournies par la bilirubine elle-même, mais par un mélange des mono et diglucuronides de la bilirubine.

D'après la constitution chimique de ces glucuronides indiquée par GRAY (5), la fonction carboxyle de l'un ou des deux restes substituants propioniques de la bilirubine est bloquée.

Le blocage de ces fonctions constitue évidemment une particularité structurelle d'incapacité de salification intramoléculaire, dans ces dérivés glucuroniques de la bilirubine. Selon COLE et LATHE (2) ils sont plus polaires que la bilirubine.

La structure de la Fig. 1, que nous attribuons à la bilirubine, interprète donc les résultats obtenus par ces auteurs, car l'impossibilité de salification intramoléculaire de l'un ou des deux restes propioniques combinés à l'acide glucuronique, conduit évidemment à des structures plus polaires.

D'autre part, la perte partielle ou totale du caractère de sel interne de ces dérivés, entraîne comme suite la conservation du caractère iminique de l'un ou des deux atomes d'azote correspondants, ce qui leur rend capables de fournir des réactions directes de VAN DEN BERGH, au moyen de la formation des triazènes correspondants, dans les milieux faiblement acides ou alcalines; ou bien, se transposant le reste azoïque dans la position *alpha* avec scission de la chaîne tetrapyrrolique, dans les milieux fortement acides ou alcalins, que conduit à la formation du dérivé iminoazoïque du glucuronide bilirubinique correspondant. Il s'agit donc d'un processus que présente une certaine similitude avec les transpositions des diazamines en aminoazoïques et d'autant plus que les positions *alpha* pyrroliques sont analogues aux positions *para* de l'aniline, selon ROBINSON (12).

Dans le cas présent, les triazènes des glucuronides bilirubiniques, seraient des diazo-imines et leur transposition, dans les milieux fortement acides ou alcalins, conduirait donc aux dérivées iminoazoïques correspondants, de la même constitution chimique indiquée par GRAY (5).

Et cette constitution chimique montre, en notre opinion, que, même dans ces dérivés glucuroniques de la bilirubine,

l'union pigment-protéine n'est pas établie au moyen des atomes d'azote iminique des noyaux 2 et 3 — ce qui rend possible qu'ils puissent fournir des réactions directes de VAN DEN BERGH —, mais au moyen de ceux des formes lactame des noyaux 1 et 2, et ceci est en complet accord avec l'interprétation de nos résultats expérimentaux concernant la structure que nous attribuons à la bilirubine.

En dehors des résultats obtenus par ces auteurs et dont leurs mono et diglucuronides bilirubiniques sont d'origine hépatique, aussi la bilirubine elle-même, peut fournir des réactions directes de VAN DEN BERGH, selon nos résultats expérimentaux, en présence de lipides et du cholestérol et dérivés, ainsi qu'en présence de très faibles quantités d'acétone, comme suite à un affaiblissement des liaisons protéine-bilirubine sous l'action de ces corps. D'autre part, et tenant compte du rôle important du foie dans leur métabolisme et de sa richesse en éléments reticulohistiocytaires, les troubles hépatiques, dans les leucoses très développées, représentent des altérations métaboliques qui rendent donc difficiles les différenciations analytiques entre la bilirubine d'origine hépatique et la bilirubine extrahépatique.

Nous avons utilisé pour cette étude, en plus des sels de diazonium indiqués plus haut, les chlorures de diazonium de l'acide sulfanilique, du sulfanylamide, du sulfathiazol, du 2-sulfanylamido-4-méthylthiazol et du 2-amino-4-méthylthiazol.

* * *

Nous remercions les professeurs GARCÍA VALDECASAS et GRAS RIERA, de la Faculté de Médecine de Barcelone, qui nous ont fourni des produits biologiques de leurs Services.

Bibliographie

- (1) BILLING, B. H., COLE, P. G., et LATHE, G. H. : *Biochem. J.*, **65**, 774, 1957.
- (2) COLE, P. G., et LATHE, G. H. : *J. clin. Path.*, **6**, 99, 1953.
- (3) GILSON, A. : *Traité Chim. Org.* (Grignard), **15**, 220 y 221, 1948.
- (4) GRAY, CHARLES, H. : *Brit. med. Bull.*, **13**, 94, 1957.
- (5) GRAY, CHARLES, H. : *Brit. med. Bull.*, **13**, 95 y 96, 1957.
- (6) LEMBERG, R. : *Australian Chem. Inst. J. and Proc.*, **6**, 170, 1939; et LEGGE, J. W. : «Hematin compounds and bile pigments», p. 102 (Interscience Publishers Inc., New York 1949).
- (7) LEMBERG, R. et LEGGE, J. W. : *Ibid.* p. 118.
- (8) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 449-467, 1958.
- (9) MONCHE, J. : Actas Tercera Reunión Nac. Sdad. Española Ciencias Fisiológicas, 199-201, 1956; *R. esp. Fisiol.*, **12**, 309-320, 1956.
- (10) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 452, 1958.
- (11) MONCHE, J. : *Revista ION*, **3**, 614-616, 1943.
- (12) ROBINSON, R. : *Institute of Chemistry Lectures*, p. 43, London, 1932.

