

SUR LE MODE D'ATTAQUE DE LA GLOBINE DE CHEVAL PAR LA TRYPSINE ET LA CHYMOTRYPSINE

par

M. ROVERY, P. DESNUELLE ET G. BONJOUR

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

Dans un récent travail¹, nous avons montré que la dégradation de la globine de cheval par la pepsine s'effectue en deux stades bien distincts. L'attaque initiale est rapide. Elle porte préférentiellement sur les liaisons alanine, phénylalanine et sérine* de la protéine et provoque la transformation complète de celle-ci en peptides "non-protéiques". Puis, les peptides "non-protéiques" subissent à leur tour une hydrolyse beaucoup plus lente au cours de laquelle la spécificité enzymatique s'atténue fortement.

Nous donnons ci-après les résultats d'une étude analogue réalisée sur des hydrolysats tryptiques et chymotryptiques de cette même globine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Caractères généraux de l'hydrolyse de la globine par la trypsine et la chymotrypsine**

La protéine est tout d'abord dissoute dans NaOH 0.1 N (16 mg/ml). La solution est amenée immédiatement à $pH = 9.7$ par HCl N, puis, après avoir reçu la quantité convenable d'enzyme, elle est placée dans un thermostat à 37°. Des échantillons sont prélevés de temps à autre et ils sont soumis aux techniques analytiques déjà décrites en détail par nous¹. Notons ici que le pH de nos milieux ne reste pas constant pendant les essais. Il tombe généralement à 7.8 vers la fin de l'hydrolyse.

Les courbes des Fig. 1 et 2 permettent de suivre, en fonction du temps, la rupture enzymatique des liaisons de la protéine ainsi que la formation des peptides "non-protéiques"***.

L'examen des courbes des Fig. 1 et 2 suggère les commentaires suivants:

1. La trypsine et la chymotrypsine, contrairement à la pepsine, n'assurent jamais une transformation complète de la globine en peptides "non-protéiques". Les proportions d'azote non-protéique (NNP), en effet, augmentent tout d'abord très rapidement. Puis, elles atteignent bientôt un palier correspondant, dans ces expériences tout au moins, à 58% (trypsine) et 70% (chymotrypsine) de l'azote protéique mis en jeu. Ces chiffres sont d'ailleurs susceptibles de varier un peu quand on passe d'une préparation de globine

* Dans une chaîne peptidique, chaque reste d'acide aminé se trouve flanqué de deux liaisons, l'une partant du côté de la fonction amine et l'autre, du côté de la fonction carboxyle. Afin de différencier ces deux liaisons, nous avons tout d'abord proposé¹ d'affecter à la première le nom, placé entre guillemets, de l'acide aminé correspondant. Il paraît beaucoup plus rationnel d'adopter la nomenclature des peptides et d'appeler, par exemple, les deux liaisons de l'alanine, l'une (côté amine) simplement liaison alanine et l'autre (côté carboxyle), liaison alanyl.

** Enzymes cristallisés commerciaux de la Maison Armour (Chicago).

*** Au cours de ces expériences, les fractions "protéiques" des hydrolysats sont précipitées par l'acide trichloracétique 0.3 M.

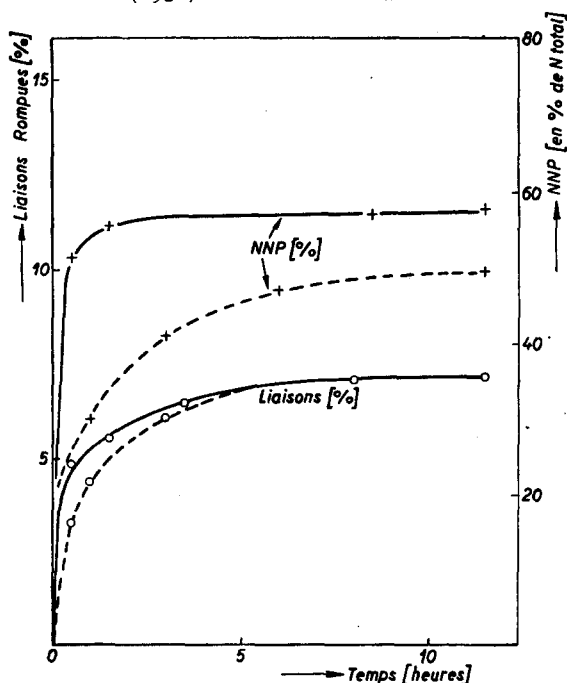


Fig. 1. Hydrolyse trypsique de la globine de cheval

Proportions pondérales enzyme/substrat:

Courbes en traits pleins: 1/150

Courbes en traits pointillés: 1/1600

II. Nature des α NH_2 libérés par l'hydrolyse trypsique et chymotrypsique

Comme dans notre précédente étude¹, nous avons traité les hydrolysats enzymatiques par l'acide periodique et le 1, 2, 4-fluorodinitrobenzène (FDNB). Ces deux techniques permettent, rappelons-le, d'étudier les aminoacides situés aux extrémités aminées des peptides, mais elles ne fournissent aucun renseignement sur leurs extrémités carboxyle. La première, fort rapide, se prête bien aux dosages en série. Elle est malheureusement limitée au domaine des β hydroxyaminoacides. La deuxième est beaucoup plus générale. Appliquée tout d'abord aux protéines par SANGER⁴, elle rend également de précieux services dans l'étude de l'hydrolyse chimique⁵ ou enzymatique^{1, 6, 7} de ces molécules.

Bibliographie p. 174.

à une autre, ou quand on modifie le rapport pondéral enzyme/substrat. Ils restent cependant toujours bien inférieurs à 100. Les deux enzymes laissent donc dans le milieu des particules possédant encore un poids moléculaire élevé. Une observation analogue, sur laquelle nous reviendrons plus loin, a été faite récemment par BUTLER² en ce qui concerne l'hydrolyse chymotrypsique de l'insuline.

2. Le nombre maximum de liaisons peptidiques hydrolysées par la chymotrypsine est légèrement supérieur à celui des liaisons scindées par la trypsine. La dégradation chymotrypsique de la globine est donc un peu plus profonde que la dégradation trypsique. Ce fait a été déjà maintes fois signalé pour d'autres protéines³.

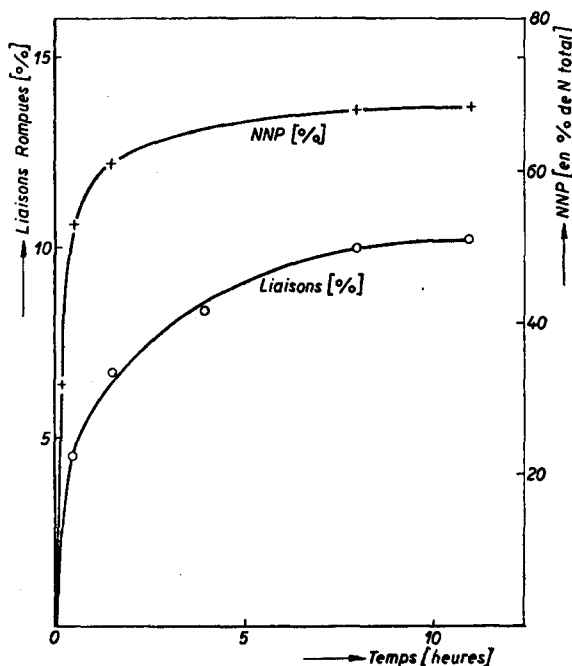


Fig. 2. Hydrolyse chymotrypsique de la globine de cheval

Proportions pondérales enzyme/substrat: 1/150

A. Oxydation périodique des hydrolysats

L'oxydation périodique des hydrolysats permet de mesurer à chaque instant le % d'hydrolyse des liaisons sérine et thréonine (Nb. de liaisons sérine et de liaisons thréonine rompues pour 100 liaisons de chaque type). Le dosage VAN SLYKE, d'autre part, fait connaître le % d'hydrolyse des liaisons totales (Nb. de liaisons totales rompues pour 100 liaisons totales). Les valeurs prises par ces divers % pendant l'attaque tryptique et chymotrypsique de la globine sont reportées de façon comparative dans les Fig. 3 et 4.

Les courbes des Fig. 3 et 4 font apparaître des différences intéressantes dans le mode d'action des deux enzymes. La trypsine, en effet, brise très aisément les liaisons thréonine de la globine, mais elle laisse les liaisons sérine à peu près intactes. La chymotrypsine, par contre, attaque rapidement les deux types de liaisons. Avec la pepsine¹, rappelons-le, les résultats sont encore différents: ce sont les liaisons sérine et non les

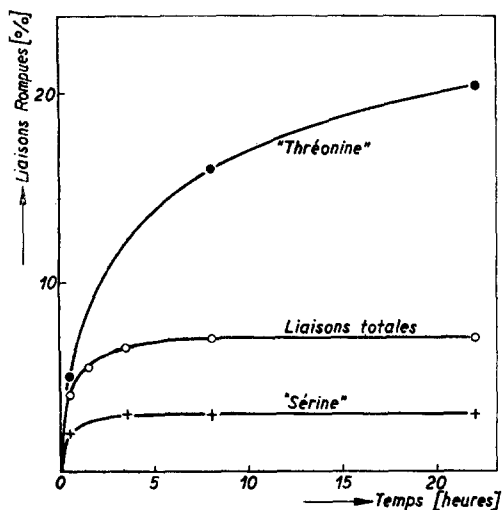


Fig. 3. Rupture tryptique des liaisons sérine et thréonine de la globine

(Proportions pondérales enzyme/substrat: 1/150)

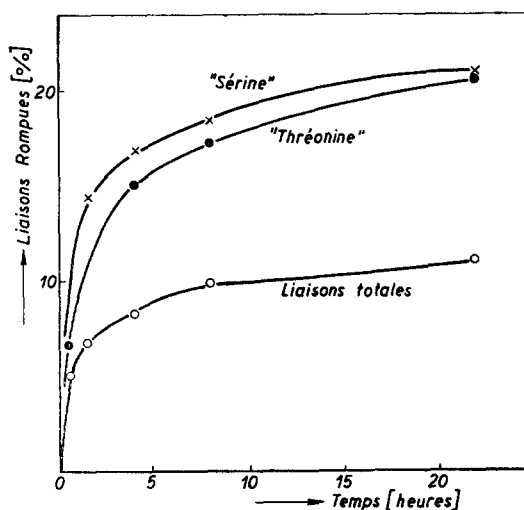


Fig. 4. Rupture chymotrypsique des liaisons sérine et thréonine de la globine

(Proportions pondérales enzyme/substrat: 1/150).

liaisons thréonine qui font l'objet d'une hydrolyse préférentielle. Bien que ces premières observations soient limitées au domaine des aminoacides β hydroxylés, elles semblent illustrer de façon particulièrement suggestive la notion depuis longtemps classique selon laquelle les endopeptidases du tube digestif attaquent les molécules protéiques en des points nettement différents⁸.

B. Traitement des hydrolysats tryptiques et chymotrypsiques par le fluorodinitrobenzène

Il nous a paru intéressant d'étudier systématiquement les α NH_2 apparus dans nos milieux, soit pendant la période de formation des peptides "non-protéiques" (début de l'hydrolyse), soit au moment où l'azote non-protéique atteint sa valeur maximum (fin de l'hydrolyse). Les hydrolysats ont été chaque fois traités par FDNB selon la méthode classique, et, après un séjour de 18-24 h dans HCl 6 N bouillant, les DNP aminoacides ont été séparés sur des colonnes convenables*.

* Notons ici qu'il est souvent avantageux de tamponner les colonnes comme l'indique BLACKBURN⁹.

Les résultats numériques fournis par cette étude sont donnés dans les Tableaux I et II. Ils montrent immédiatement que la trypsine et la chymotrypsine attaquent préférentiellement dans la globine certains types de liaisons peptidiques. Afin de traduire ce fait d'une façon aussi suggestive que possible, nous avons joint aux résultats précédents ceux antérieurement obtenus avec la pepsine et nous avons calculé les "index de spécificité" des trois enzymes pour les différentes liaisons. La signification de ces index se comprendra facilement sur un exemple concret: Soit un hydrolysate de globine dans lequel, en moyenne, 30 liaisons par mol. ont été rompues. Sur ces 30 liaisons, supposons que 6 soient des liaisons phénylalanine. Comme la molécule de globine contient, d'après les estimations les plus récentes, environ 555 liaisons peptidiques et 28 liaisons phénylalanine, l'enzyme a hydrolysé $\frac{6}{28} \times 100 = 21.5\%$ des liaisons phénylalanine et $\frac{30-6}{555-28} = 4.5\%$ des autres liaisons. Nous dirons alors que l'index de spécificité de cet enzyme pour les liaisons phénylalanine est $21.5/4.5 = 4.8$. Considérons maintenant 3 cas particuliers: a. L'enzyme se révèle incapable d'hydrolyser les liaisons phénylalanine; l'index est nul. b. L'enzyme attaque ces liaisons à une vitesse égale à la vitesse moyenne d'hydrolyse; l'index prend la valeur 1. c. L'attaque enzymatique, enfin, porte exclusivement sur les liaisons phénylalanine; l'index est infini.

Autrement dit, tout index compris entre 1 et l'infini indique que l'enzyme attaque les liaisons correspondantes plus vite que les autres liaisons de la protéine. Tout index compris entre 0 et 1 traduit, au contraire, une attaque plus lente. En outre, plus l'index s'écarte, dans un sens ou dans l'autre, de la valeur 1 et plus le comportement de l'enzyme vis-à-vis des liaisons correspondantes s'éloigne de son comportement moyen vis-à-vis des autres liaisons peptidiques de la protéine.

On trouvera dans le Tableau III les valeurs caractéristiques prises par ces index au cours de l'hydrolyse pepsique, trypsique et chymotrypsique de la globine.

TABLEAU I
LIAISONS ROMPUES PENDANT L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA GLOBINE
(Proportions pondérales *enzyme/substrat*: 1/1600)

	Nb. moyen de liaisons rompues dans 1 mol. de globine (63 400 g)	
	Au début de l'hydrolyse { Durée: $\frac{1}{2}$ h NNP: 26% de N total	A la fin de l'hydrolyse { Durée: 15 h NNP: 53% de N total
Liaisons peptidiques totales (VAN SLYKE)	21.0	38.8
Liaisons alanine	8.3	8.0
Liaisons phénylalanine	5.3	9.7
Liaisons thréonine	1.5	3.0
Liaisons valine	1.4	5.0
Liaisons leucine	—	2.8
Liaisons tryptophane	(1.8)	(3.4)
Autres liaisons	2.0	6.7
Total des liaisons précédentes (FDNB)	20.3	38.6

TABLEAU II
LIAISONS ROMPUES PENDANT L'HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DE LA GLOBINE
(Proportions pondérales *enzyme/substrat*: 1/500)

	Nb. moyen de liaisons rompues dans 1 mol. de globine (63 400 g)	
	Au début de l'hydrolyse { Durée: ½ h NNP: 38% de N total	A la fin de l'hydrolyse { Durée: 4 h ¾ NNP: 75% de N total
Liaisons peptidiques totales (VAN SLYKE)	23.2	68.0
Liaisons alanine	8.4	16.6
Liaisons phénylalanine	4.5	4.2
Liaisons sérine	3.0	6.8
Liaisons thréonine	2.2	4.9
Liaisons histidine	—	8.3
Liaisons arginine	—	4.3
Autres liaisons	3.0	13.0
Total des liaisons précédentes (FDNB)	21.1	58.1

TABLEAU III

VALEURS PRISES PAR QUELQUES INDEX DE SPÉCIFICITÉ PENDANT L'HYDROLYSE DE LA GLOBINE PAR
LA PEPSINE, LA TRYPSINE ET LA CHYMOTRYPSINE

(Les index ont été calculés à partir des chiffres des Tableaux I et II pour ce qui concerne respectivement, la trypsine et la chymotrypsine; à partir des chiffres du Tableau VI de notre précédente publication¹ pour ce qui concerne la pepsine)

Types de liaisons	Index de spécificité					
	Au début de l'hydrolyse			A la fin de l'hydrolyse		
	Pepsique (14 liaisons rompues par mol.)	Trypsique (21 liaisons rompues par mol.)	Chymo- trypsique (23 liaisons rompues par mol.)	Pepsique (55 liaisons rompues par mol.)	Trypsique (39 liaisons rompues par mol.)	Chymo- trypsique (68 liaisons rompues par mol.)
Alanine	4.5	6.0	5.6	3.2	2.4	3.3
Phénylalanine	5.6	6.2	4.8	3.0	6.3	1.4
Sérine	3.3	t.f.	2.3	2.3	t.f.	1.7
Thréonine	1.2	1.7	2.4	—	1.8	1.8
Histidine	t.f.	—	—	t.f.	—	2.3
Arginine	t.f.	t.f.	—	t.f.	t.f.	1.8
Leucine	2.3	—	t.f.	0.4	0.5	t.f.
Valine	0.0	0.9	t.f.	0.0	1.8	t.f.
Tryptophane	0.0	(7.8)	t.f.	t.f.	(7.5)	—
Autres liaisons	t.f.	0.2	0.3	0.6	0.3	0.5

Le symbole t.f. (très faible) indique que le DNP aminoacide correspondant se trouvait en quantités trop minimes pour pouvoir être dosé.

Bibliographie p. 174.

Les résultats donnés par les Tableaux I, II et III permettent d'amorcer une étude comparée de la nature des liaisons peptidiques rompues, au sein de la globine, par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. Il convient de noter, en particulier, que:

1. Si les enzymes choisissent *au hasard* les liaisons qu'elles vont rompre, tous les aminoacides devraient apparaître aux extrémités aminées des peptides, dans les proportions mêmes où ils se trouvent dans la molécule protéique. Les index de spécificité, tels qu'ils ont été définis plus haut, seraient alors constamment égaux à l'unité. Nos expériences prouvent au contraire que les trois endopeptidases étudiés rompent de préférence les chaînes peptidiques à côté de certains aminoacides bien déterminés*.

2. Quand la protéolyse est prise à son début, au moment où ses progrès sont rapides, la spécificité dans les ruptures se révèle en général fort nette. C'est ainsi par exemple (Tableau III; colonnes "début d'hydrolyse") que certaines liaisons se voient attribuer des index atteignant 4, 5 ou même 6 tandis que l'index des "autres liaisons" (c'est-à-dire l'index moyen de toutes les liaisons ne figurant pas au tableau) est, soit très faible (pepsine), soit égal à 0.2 (trypsine) ou 0.35 (chymotrypsine). Puis, au fur et à mesure que la protéolyse approche, avec une vitesse décroissante, de son terme, la spécificité initiale s'atténue.

3. C'est pour les liaisons alanine et phénylalanine de la globine que les *trois* enzymes semblent manifester l'affinité la plus grande et la plus constante. Il nous est d'ailleurs impossible de dire encore si ce fait traduit un caractère fondamental de l'action endopeptidasique ou s'il est dû seulement à une particularité structurale de la globine.

4. En outre, chaque enzyme manifeste dans nos expériences une spécificité secondaire qui lui est propre. Nous ne reviendrons pas ici sur le cas des liaisons sérine et thréonine déjà discuté au paragraphe précédent. Soulignons donc simplement, à titre d'exemple, que les liaisons arginine et histidine de la globine subissent une hydrolyse chymotrypsique assez vive tandis qu'elles échappent complètement à l'action de la pepsine. Le cas des liaisons valine présente, d'autre part, un intérêt particulier car l'acide correspondant occupe les extrémités aminées de toutes les chaînes peptidiques de la globine**. Nous voyons que la trypsine seule attaque ces liaisons de façon notable. Quant aux liaisons tryptophane, elles semblent subir une profonde hydrolyse trypsique. Mais leur nombre total est si faible que l'exactitude des résultats les concernant ne peut être garantie.

5. Le présent travail ne donne évidemment aucun renseignement sur les aminoacides situés aux extrémités carboxyle des peptides. Il n'est donc pas exclu que la véritable spécificité enzymatique soit dirigée vers le côté carboxyle de certaines liaisons. Nos résultats ne seraient alors que la manifestation indirecte de cette spécificité, compte tenu de l'ordre de succession des restes le long des chaînes peptidiques de la globine.

* Il doit être bien entendu que ces observations ne sont valables que pour la dégradation de la globine de cheval. Leur caractère de plus ou moins grande généralité ne pourra être fixé qu'après de nombreuses études systématiques portant sur des substrats protéiques différents. Notons dès maintenant que l'hydrolyse pepsique de l'albumine d'œuf, qui, à bien des égards d'ailleurs est anormale, semble beaucoup moins spécifique¹ que celle de la globine.

** Notons ici que, dans ce travail comme dans le précédent¹, nous trouvons constamment 5 α NH₂ valine par mol. de globine tandis que PORTER¹⁰ en signale 6. Cette différence provient du fait suivant: Désirant pouvoir retrancher les résultats obtenus avec la globine intacte de ceux obtenus avec ses hydrolysats, nous devons opérer chaque fois dans les mêmes conditions. Nous n'isolons donc pas la DNP-globine et nous basons simplement nos calculs sur la quantité d'azote protéique mis en jeu au début de l'essai. Mais, quand nous isolons la DNP-globine et calculons, comme SANGER⁴ et PORTER¹⁰, la quantité de globine qu'elle contient, par une détermination de N-amide, nous trouvons bien 6 α NH₂ par mol.

III. *Etude succincte des fractions protéiques et non-protéiques des hydrolysats*

Ces résultats étant acquis, il nous a paru intéressant de fractionner nos hydrolysats par l'acide trichloracétique et d'étudier séparément leurs fractions "protéique" et "non-protéique". Nous avons, dans chaque cas, arrêté l'hydrolyse au moment où la courbe du NNP, après une montée régulière et rapide, s'infléchit brusquement vers l'horizontale (voir courbes des Fig. 1 et 2). Nos fractions "protéiques" peuvent donc, en première approximation, être rapprochées du "core" obtenu par BUTLER², ⁶ à la fin de la digestion chymotrypsique de l'insuline. Ce rapprochement ne saurait d'ailleurs être poussé très loin car les fractions "protéiques" des hydrolysats de globine sont assez mal définies. Leur importance relative par rapport à l'ensemble de l'hydrolysat et le poids moléculaire moyen des particules qu'elles renferment semblent en effet varier notablement selon la préparation de globine en jeu, les proportions pondérales *enzyme/substrat* ainsi que la nature et la concentration de l'agent de précipitation. Les expériences qui vont suivre n'ont donc nullement l'ambition de servir à caractériser un ou plusieurs produits définis prenant naissance au cours de la dégradation de la globine. Elles fournissent simplement quelques renseignements sur les particules à haut poids moléculaire, d'une part, et les peptides à bas poids moléculaire, d'autre part, présents dans les hydrolysats enzymatiques de cette protéine.

On ajoute tout d'abord de l'acide trichloracétique aux hydrolysats jusqu'à ce que la concentration atteigne 0.125 *M*. On recueille les fractions "protéiques" et on les lave soigneusement. Puis, deux parts en sont faites. La première est traitée par FDNB selon la technique classique. La seconde, après dissolution dans un peu de soude diluée, est soumise au dosage VAN SLYKE. Quant aux fractions "non-protéiques", elles sont débarrassées de leur acide trichloracétique par extraction à l'éther en continu¹¹, puis elles sont concentrées sous vide et soumises au dosage VAN SLYKE.

Le Tableau IV présente les principaux résultats obtenus au cours de cette étude. Afin de faciliter leur compréhension, notons que le nombre de groupes α NH_2 présents dans un certain poids d'hydrolysat ou d'une quelconque de ses fractions peut, *a priori*, être calculé, soit en se basant sur la teneur en N-NH_2 (VAN SLYKE) soit en faisant la somme des divers DNP aminoacides séparés par chromatographie. Mais, dans le cas présent, le problème est un peu plus complexe car, comme nous l'avons récemment signalé¹², les restes de la lysine (et, par conséquent, les groupes ϵ NH_2) se trouvent inégalement répartis entre les deux fractions des hydrolysats tryptiques et chymotryptiques. Il y a donc lieu, pour tenir compte de ce fait, d'apporter une certaine correction aux chiffres VAN SLYKE relatifs aux deux fractions. Une fois corrigés, d'ailleurs, ces chiffres sont généralement en bon accord avec ceux fournis par la technique chromatographique.

Le Tableau V, d'autre part, donne quelques détails complémentaires sur les extrémités aminées des peptides "non-protéiques" et des particules "protéiques" se trouvant dans les milieux d'hydrolyse chymotrypsique.

Toutes les raisons précédemment énumérées nous empêchent d'entreprendre dès maintenant une discussion approfondie des résultats donnés par les Tableaux IV et V. Nous nous contenterons donc, jusqu'à plus ample informé, de remarquer que, sous l'influence de la trypsine et de la chymotrypsine, la molécule de globine donne naissance, d'une part, à toute une série de peptides "non-protéiques" contenant, en moyenne, 8 restes d'acides aminés et, d'autre part, à des particules possédant encore un poids moléculaire moyen élevé. Nos expériences, d'ailleurs, nous permettent uniquement d'affecter à ce poids moléculaire une valeur moyenne *minimum* (3400 pour les hydrolysats

trypsiques; 2600 pour les hydrolysats chymotrypsiques) car les particules "protéiques" peuvent parfaitement, comme la globine elle-même, être constituées de plusieurs chaînes peptidiques. Leur poids moléculaire moyen serait alors un multiple des valeurs précédemment indiquées.

TABLEAU IV

QUELQUES RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES FRACTIONS "PROTÉIQUES" ET "NON-PROTÉIQUES" DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES ET CHYMOTRYPSIQUES

(Les conditions expérimentales sont identiques à celles des essais "fin d'hydrolyse" des Tableaux I et II)

	Hydrolysats entiers		Fraction protéique correspondante		Fraction non-protéique correspondante	
	Trypsique (63 400 g)	Chymo- trypsique (63 400 g)	Trypsique (31 700 g)	Chymo- trypsique (15 850 g)	Trypsique (31 700 g)	Chymo- trypsique (47 550 g)
Nb. de ε -NH ₂ lysine	40.0	40.5	15.5	6.1	24.5	34.4
{ Nb. de α -NH ₂ totaux 1. par VAN SLYKE (après correction) 2. par SANGER	44.0	72.2	9.3	6.6	34.7	56.6
	44.0	61.9	9.5	5.5	34.5	56.4
Longueur moyenne des chaînes peptidiques	12.8	8.4	29.8	23.2	8.1	7.5
Nb. de α -NH ₂ valine	10.0	4.8	4.9	2.3	5.1	2.5

TABLEAU V

RÉPARTITION DE QUELQUES α -NH₂ ENTRE LES FRACTIONS "PROTÉIQUE" ET "NON-PROTÉIQUE" DES HYDROLYSATS CHYMOTRYPSIQUES

(Mêmes conditions expérimentales que précédemment)

Nature des α -NH ₂	Nb. des α -NH ₂ dans		
	l'hydrolysats entier (63 400 g)	sa fraction "protéique" (15 850 g)	sa fraction "non-protéique" (47 550 g)
Valine	4.8	2.3	2.5
Alanine			
+ Phénylalanine	20.8	0.7	20.1
Hydroxyaminoacides			
+ Ac. glutamique	14.4	0.4	14.0
Histidine	8.3	0.4	7.9
Arginine	4.2	1.2	3.0
Autres aminoacides	9.4	0.5	8.9
<i>Total</i>	61.9	5.5	56.4

Notre étude détaillée des hydrolysats chymotrypsiques nous montre en outre que la moitié environ des α NH₂ valine de la globine initiale se retrouve dans les particules

"protéiques". Les α NH₂ alanine et phénylalanine, par contre, qui, on le sait, se forment avec une particulière abondance pendant la protéolyse, se retrouvent presque intégralement dans les petits peptides "non-protéiques". Enfin, 63 400 g de globine (1 mol.) ont donné naissance, dans notre expérience, à une fraction "protéique" pesant 15 850 g. Cette fraction contient environ 6 α NH₂ sur lesquels 2.3 appartiennent à la valine, 1.2 à l'arginine, 0.4 à l'histidine et 0.7 à l'alanine et à la phénylalanine.

RÉSUMÉ

1. La trypsine et la chymotrypsine, comme d'ailleurs la pepsine, n'hydrolysent pas au hasard les liaisons peptidiques de la globine de cheval. L'action des trois enzymes semble influencée, dans une certaine mesure, par la nature de l'acide aminé situé du côté aminé de la liaison. Cette influence est surtout sensible au début de la protéolyse.

2. Les trois endopeptidases étudiées semblent manifester une affinité particulière pour les liaisons alanine et phénylalanine de la globine. En outre, chaque enzyme présente, dans nos expériences, une spécificité secondaire qui lui est propre.

3. La trypsine et la chymotrypsine, contrairement à la pepsine, se révèlent incapables d'assurer la transformation complète de la globine en peptides "non-protéiques". Les fonctions aminées des particules "protéiques" restant à la fin de l'hydrolyse chymotryptique de la globine ont fait l'objet d'une étude détaillée.

SUMMARY

1. Trypsin and chymotrypsin, like pepsin, do not hydrolyse at random the peptide bonds of horse globin. The action of the three enzymes seems to be influenced to certain degree by the nature of the amino-acid situated at the amino side of the bond. This influence is noticeable especially at the beginning of the proteolysis.

2. The three endopeptidases investigated seem to display a particular affinity towards the alanine and phenylalanine bonds of the globin. Furthermore, each enzyme shows, in our experiments, a secondary specificity peculiar to itself.

3. Trypsin and chymotrypsin, in contrast with pepsin, were shown to be incapable of effecting a complete transformation of globin to "non-protein" peptides. The amino groups of the "protein" particles remaining at the end of the chymotryptic hydrolysis of globin have been investigated in detail.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Trypsin und Chymotrypsin, sowie übriges Pepsin, hydrolysieren nicht willkürlich die Peptidbindungen des Pferdeglobins. Die Wirkung der drei Enzyme scheint gewissermassen durch die Art der Aminosäure beeinflusst zu werden, die an der Aminoseite der Bindung sitzt. Dieser Einfluss ist insbesondere zu Beginn der Proteolyse fühlbar.

2. Die drei untersuchten Endopeptidasen scheinen für die Alanin- und Phenylalaninbindungen des Globins eine besondere Affinität zu haben. Ausserdem zeigte jedes einzelne Enzym in unseren Versuchen eine sekundäre, ihm eigene Spezifität.

3. Es zeigt sich ferner, dass Trypsin und Chymotrypsin, zum Unterschied von Pepsin, das Globin nicht vollständig in "Nicht-Protein-Peptide" verwandeln können. Die Aminfunktionen der "Protein" Fraktionen, die nach der Hydrolyse mit Chymotrypsin zurückbleiben wurden eingehend untersucht.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. DESNUELLE, M. ROVERY ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 116.
- ² J. A. V. BUTLER, E. C. DODDS, D. M. P. PHILLIPS ET J. L. M. STEPHEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 116.
- ³ L. MILLER, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 23 (1939) 45.
- ⁴ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ⁵ P. DESNUELLE ET A. CASAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 64.
- ⁶ J. A. V. BUTLER, D. M. P. PHILLIPS ET J. M. L. STEPHEN, *Nature*, 162 (1948) 418.
- ⁷ D. M. P. PHILLIPS ET J. M. L. STEPHEN, *Nature*, 162 (1948) 152.
- ⁸ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, New-York (1948) p. 120.
- ⁹ S. BLACKBURN, *Biochem. J.*, 45 (1949) 579.
- ¹⁰ R. R. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- ¹¹ D. M. P. PHILLIPS, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 341.
- ¹² M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1112.

Reçu le 8 avril 1950