

SUR LES AMINOACIDES LIBÉRÉS PENDANT L'HYDROLYSE DE LA GLOBINE DE CHEVAL PAR LA PEPSINE, LA TRYPSINE ET LA CHYMOTRYPSINE CRISTALLISÉES

par

M. ROVERY ET P. DESNUELLE

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,
Marseille (France)*

On sait que le résultat principal de l'hydrolyse des protéines par les endopeptidases digestives est de transformer ces molécules en une série de peptides dont la longueur moyenne varie selon les conditions expérimentales (nature et proportions relatives de l'enzyme et de son substrat, durée du traitement etc. . . .). On pense généralement toutefois que, à côté de ces peptides, il se forme pendant la protéolyse des quantités faibles mais significatives d'*aminoacides libres*. Cette opinion est basée sur quelques expériences d'ordre qualitatif et quantitatif. Pour la commodité de l'exposé, nous envisagerons tout d'abord le point de vue quantitatif.

Les aminoacides libres d'un hydrolysats peuvent être déterminés grâce à la méthode dite du N-COOH préconisée par VAN SLYKE¹. L'application de cette méthode aux hydrolysats endopeptidasiques a donné jusqu'ici certains résultats que nous avons réunis dans le Tableau I.

En examinant les chiffres du Tableau I, on s'aperçoit que le rapport N-COOH/N-NH₂ n'est jamais nul et qu'il prend même quelquefois des valeurs très notables. Or, si le dosage est correct, ce rapport doit nous indiquer le nombre de mol d'aminoacides libérés pour 100 liaisons peptidiques rompues. Les endopeptidases seraient donc ainsi parfaitement capables de libérer des aminoacides.

Il convient toutefois de se demander quelle confiance on peut accorder ici au dosage du N-COOH. Ce dosage est certainement satisfaisant quand les proportions molaires des aminoacides sont analogues à celles des peptides. Mais, dans le cas présent, la quantité de N-COOH mesuré atteint rarement 1 % du N total*. Des erreurs importantes peuvent donc être provoquées, soit par le dosage lui-même, soit par un léger défaut de spécificité de la méthode**.

Si l'on admet malgré tout que des aminoacides soient réellement libérés par les endopeptidases, il peut paraître intéressant d'en connaître la nature. Peu de travaux

* En outre, les auteurs négligent bien souvent d'indiquer le N-COOH initial. Il est donc possible que le N-COOH réellement apparu pendant l'hydrolyse soit quelquefois un peu inférieur au N-COOH final.

** Parmi les peptides étudiés par VAN SLYKE¹, seuls les γ et les δ peptides des acides aspartique et glutamique fournissent une grosse quantité de CO₂ en présence de ninhydrine. Jusqu'à plus ample informé, l'existence de tels peptides dans les hydrolysats protéiques semble peu probable. Mais il convient de remarquer tout de même que de nombreux peptides "classiques" donnent près de 2 mol de CO₂ pour 100 mol, ce qui, dans le cas qui nous occupe ici, n'est pas négligeable. On verra en effet plus loin que la quantité apparente d'aminoacides dans les hydrolysats endopeptidasiques est de l'ordre de 8 mol pour 100 mol de peptides.

TABLEAU I

ESTIMATION, PAR DOSAGE À LA NINHYDRINE, DES AMINOACIDES LIBÉRÉS PENDANT L'HYDROLYSE ENDOPEPTIDASIQUE

Enzyme	Substrat	Poids enzyme/ Poids substrat (%)	Durée (h)	$\frac{N-COOH}{N-NH_2} \times 100$	Références
Pepsine cristallisée	β -lactoglobuline	0.015	3	9-19	2
	caséine (vache)	0.5	36	11	3
	Sérum albumine (boeuf)	0.5	4	< 1	4
	Fibrine (boeuf)	14	0.5	28	4
	Fibrine (boeuf)	14	1.0	11	4
	Fibrine (boeuf)	20	0.25	22	4
	Fibrine (boeuf)	20	0.75	13	4
	Fibrine (boeuf)	20	2	8	4
	Globine (cheval)	3.3	0.5	7	5
	Globine (cheval)	3.3	3	12	5
	Globine (cheval)	3.3	24	11	5
	Albumine d'oeuf	3.3	0.5	16	5
	Albumine d'oeuf	3.3	24	23	5
	Albumine d'oeuf	1.0	24	2	4
	Insuline	0.3	24	7	6
Trypsine cristallisée	Caséine (vache)	0.5	36	11	3
	Caséine (vache)	10	20	7	1
	γ -Globuline (homme)	4.0	24	< 1	4
	Sérum albumine (boeuf)	1.0	24	4	4
	Sérum albumine (boeuf)	1.0	48	6	4
Chymotrypsine cristallisée	Caséine (vache)	0.5	36	25	3
	Insuline	—	3	10	7
	Insuline	—	30	15	7

vraiment systématiques ont été effectués dans ce domaine. Ne disposant pas de techniques analytiques convenables, les expérimentateurs ont, pour la plupart, concentré leur attention sur un ou deux aminoacides faciles à identifier. Ils ont en outre étudié des hydrolyses tellement longues que la signification physiologique et même enzymatique de leurs résultats demeure discutable. Quoi qu'il en soit, de nombreux essais ont été effectués en vue de caractériser des aminoacides libres dans les hydrolysats pepsiques* (Tableau II).

Notons avec intérêt dans ce tableau que l'autolyse de la pepsine fournit des quantités considérables de tyrosine libre. On en a isolé à l'état cristallisé 10%¹¹ et même 40%¹⁴ de la quantité totale contenue dans l'enzyme traité (soit 1.6 et 6.4 mol par mol d'enzyme en jeu). De plus, 10% de la tyrosine de l'albumine d'oeuf (soit 0.9 mol par mol) ont été recueillis après une digestion pepsique de 26 jours¹¹. Or, on sait d'autre part que l'un des substrats spécifiques de la pepsine contient de la tyrosine du côté aminé de la liaison sensible¹⁵ et que l'activité de cet enzyme semble affectée par le blocage de ses groupes phénol¹⁶.

Nous avons donc jugé utile de reprendre le problème dans son ensemble en profitant

* Les hydrolysats papaïniques de la laine semblent contenir de fortes quantités de glycocholate libre¹⁷. La tyrosine, la phénylalanine, le tryptophane, la leucine et l'isoleucine ont aussi été caractérisés dans les hydrolysats papaïniques de fibrine de boeuf¹⁸.

TABLEAU II
ETUDE QUALITATIVE DES AMINOACIDES LIBÉRÉS PAR LA PEPSINE

Substrat	Durée de l'hydrolyse (jours)	Aminoacide étudié (+) présent (-) absent (O) douteux	Moyens d'étude	Références
Caséine	—	Cystine (—)	Colorimétrie	8
Thymohistone	10	Lysine (+)	Isolement	9
Diverses protéines	—	Arginine (+)	Isolement	10
Albumine d'oeuf	21	Tyrosine (+)	Isolement	11
Albumine d'oeuf	—	Tyrosine (O)	Chromatographie	12
		Cystine (O)		
Pepsine *	1	Tyrosine (+)	Isolement	11, 14

* Par autolyse.

des vastes possibilités offertes par les techniques chromatographiques modernes. Le présent travail représente la suite logique de nos précédentes études sur l'hydrolyse enzymatique des diverses liaisons peptidiques au sein des protéines^{5,10}. Il a été réalisé lui aussi avec la globine de cheval et les endopeptidases cristallisées (pepsine, trypsine et chymotrypsine) de la Maison Armour.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. TECHNIQUES UTILISEES

L'étude des aminoacides libres dans les hydrolysats endopeptidasiques rencontre de sérieuses difficultés techniques. Les aminoacides, s'il y en a, sont présents en très faibles quantités tandis que les peptides et les sels minéraux abondent. Il est néanmoins indispensable de serrer le problème de fort près et de savoir, par exemple, si une fraction de mol de tel aminoacide (rapportée à 1 mol de protéine) a été libérée ou non pendant la protéolyse. Notre principal souci a donc été de trouver diverses techniques qui nous débarrassent des substances gênantes sans éliminer en même temps aucune trace des 20 aminoacides naturels. Une fois convenablement purifiés, les hydrolysats ont été ensuite soumis à des techniques chromatographiques classiques.

A. Techniques de purification

1. *Précipitation à l'alcool*. L'hydrolyse enzymatique est arrêtée par un chauffage de 5 min à 80°. Les milieux sont amenés à $p_H = 7.8$ (point isoélectrique de la globine dénaturée) puis ils sont additionnés de 10 fois leur volume d'alcool²⁰. Après une nuit à la glacière, on filtre et on évapore sous vide le liquide clair.

2. *Dessalage*. Les liquides précédents doivent être ensuite dessalés. L'ionophorèse selon CONDÉN²¹ nous a donné de bons résultats avec les hydrolysats pepsiques relativement pauvres en sels et nous avons pu vérifier, par exemple, que 10 ml d'une solution de NaCl $M/15$ contenant 320 μg de tous les aminoacides (0.4 mol par mol de globine d'après nos conditions expérimentales) est dessalée en 20 min sans perte sensible. Toutefois, les hydrolysats tryptiques et chymotryptiques contiennent beaucoup plus de sels. Leur dessalage est donc notablement plus long, ce qui provoque la disparition d'une partie de l'arginine et de la lysine*. Pour étudier ces deux hydrolysats, nous avons donc dû renoncer au dessalage ionophorétique et utiliser l'extraction par l'acétone chlor-

hydrique selon BOULANGER²². Des mélanges contenant 8–32 μg de tous les aminoacides (en présence ou non de protéine hydrolysée et de sels) ont été traités par cette méthode sans qu'un seul aminoacide soit perdu. En outre, aucune hydrolyse des peptides ne se produit pendant l'extraction car les hydrolysats peptiques donnent des résultats identiques après un dessalage par ionophorèse ou par l'acétone.

3. *Colonnes de charbon*. L'acétone possède, dans notre cas tout au moins, un autre avantage: elle dissout très peu de peptides et les extraits, directement appliqués sur papier, donnent des chromatogrammes clairs. Après dessalage ionophorétique, par contre, les solutions contiennent encore beaucoup de peptides qui brouillent les chromatogrammes et modifient même les R_F des aminoacides. Les hydrolysats peptiques, pour lesquels l'ionophorèse a été utilisée, ont donc été passés sur une colonne de charbon qui, d'une part, permet d'obtenir les aminoacides aromatiques et non-aromatiques dans deux fractions différentes²³ et qui, d'autre part, retient irréversiblement certains peptides gênants. Des témoins nous ont montré que la technique est applicable à des quantités d'acides aminés extrêmement faibles. C'est ainsi par exemple que 200–1000 μg d'histidine, de sérine, de tyrosine et de phénylalanine en solution dans 2 ml d'acide acétique à 5% (saturé en H_2S) sont mis sur une colonne de 500 mg d'Activit éphédriné. 17 ml d'acide acétique éluent tous les aminoacides non-aromatiques (F_1). Les 7 ml suivants (F_2) ainsi que 5 ml d'eau saturée en acétate d'éthyle et en H_2S (E_1) n'entraînent aucun aminoacide. Les aminoacides aromatiques, enfin, se retrouvent intégralement dans les 7 ml suivants d'eau saturée (E_2).

B. Identification chromatographique

1. *Chromatographie sur papier*. Les liquides, une fois purifiés comme il vient d'être dit, sont appliqués sur papier Whatman no 1 et des chromatogrammes mono et bi-dimensionnels sont effectués à l'aide du phénol et du mélange butanol-acide formique. Certaines taches peuvent être immédiatement négligées à cause de leur position. Mais les autres taches contiennent-elles uniquement l'acide aminé dont elles occupent la place ou un peptide de comportement identique ou, enfin, un mélange d'acide aminé et de peptide? La question est importante car l'identification même des aminoacides libres dépend du choix entre les possibilités (1), (2) et (3). Du choix entre les possibilités (1) et (2), dépend, d'autre part, l'estimation quantitative éventuelle de ces aminoacides.

De multiples essais nous ont alors montré que la solution du problème ne pouvait pas être recherchée par la méthode classique consistant à éluer les taches et à hydrolyser l'éluat²¹. Ces hydrolysats nous ont toujours donné des chromatogrammes assez complexes dans lesquels la tache de l'acide aminé attendu, généralement prédominante, se trouvait accompagnée par une ou plusieurs autres taches. La chromatographie sur papier n'a pu nous donner que des renseignements d'ordre négatif. Elle nous a permis, en d'autres termes, d'affirmer que les hydrolysats endopeptidasiques étaient certainement dépourvus de tel ou tel aminoacide. Mais, dans l'ordre positif, elle ne nous a fourni que des réponses provisoires, susceptibles certes de nous orienter utilement, mais exigeant une confirmation ultérieure.

* Après dessalage d'un mélange contenant 320 μg de chaque aminoacide dans 15 ml de NaCl M/5, la lysine a presque complètement disparu, même si des précautions sont prises afin d'éviter la diffusion du chlore dans le compartiment cathodique. L'arginine, en outre, est partiellement décomposée. Sur chromatogramme monodimensionnel (phénol-acide acétique), elle forme deux taches; l'une ($R_F = 0.74$) est normale, l'autre ($R_F = 0.50$) ne donne plus la réaction de SAKAGUCHI. Ces phénomènes de décomposition ne deviennent d'ailleurs sensibles que lorsque des traces d'acides aminés se trouvent comme ici en présence de beaucoup de sels minéraux.

2. *Chromatographie des DNP-aminoacides.* Cette confirmation a été obtenue en utilisant les dérivés dinitrophénylés (DNP). Nous avons trouvé en effet qu'une très grosse partie des DNP-peptides de nos hydrolysats était insoluble à la fois dans l'eau acide et dans l'éther. Ces peptides peuvent donc être facilement éliminés au moment où l'on sépare les fractions hydro et éthérosolubles²⁴. Par suite, les chromatogrammes sur colonne de silicagel sont simples et les DNP-aminoacides éventuellement présents sont aisément identifiés* puis dosés. Tous les témoins nécessaires ont été faits afin de s'assurer que les DNP-peptides insolubles ne retenaient pas de DNP-aminoacides et afin de connaître le coefficient de perte applicable aux calculs ultérieurs. Pour plus de sûreté, enfin, les bandes attribuables aux DNP-aminoacides libres ont été hydrolysées dans HCl 6 N pendant 18 h. Aucun aminoacide parasite n'a pu être trouvé dans la fraction hydro-soluble de ces hydrolysats.

II. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les dispositions prises pendant les hydrolyses enzymatiques ont déjà été décrites en détail^{15, 19}. Notons donc simplement que nous avons utilisé ici suffisamment d'enzyme et étudié des hydrolyses assez longues pour que le dosage du N-COOH fournisse des valeurs notables. Il est bien évident en effet que notre étude chromatographique aurait été inutile si les résultats de ce dosage, qui semble ne pouvoir pêcher que par excès, avaient été nuls ou très faibles. En aucun cas cependant la durée des expériences n'a excédé 5 h.

TABLEAU III

CONDITIONS OPÉRATOIRES PENDANT LES HYDROLYSES ENZYMATIQUES

Enzyme utilisé	Poids enzyme/ Poids globine (%)	Concentration de la globine (g pour 100 ml)	Durée de l'hydrolyse (h)	pH
Pepsine	3.3	2.9	3	1.8
Trypsine	0.66	2.2	5	9.7
Chymotrypsine	0.20	2.1	5	9.7

On se reportera également à nos précédentes publications pour connaître les effets généraux de l'hydrolyse dans les conditions où nous nous sommes placés (Tableau III). Cette hydrolyse est sortie, dans chaque cas, de sa phase préliminaire rapide. L'azote non-protéique a complètement disparu depuis 2 h environ des hydrolysats pepsiques. Il a atteint son maximum (respectivement 60 et 75%) dans les hydrolysats tryptiques et chymotryptiques. Nous avons ainsi étudié des milieux d'une composition à peu près constante sans prolonger malgré tout la durée des expériences de façon excessive.

A. Dosage du N-COOH dans les hydrolysats endopeptidasiques de globine.

Nous avons déjà mentionné dans l'introduction la teneur en N-COOH de divers hydrolysats endopeptidasiques. Afin de permettre toutefois une comparaison précise avec les résultats qui vont suivre, nous avons voulu connaître les proportions de cette forme d'azote dans nos propres milieux. La technique suivie a été essentiellement celle

* Cette identification est grandement facilitée par l'étude préalable des chromatogrammes sur papier qui permet de concentrer son attention sur une zone précise des colonnes et de négliger a priori toutes les autres bandes.

indiquée par VAN SLYKE²⁵. Les milieux, amenés à p_H 2.5*, ont été chauffés 1/4 h en présence de ninhydrine. Aucune correction n'a été faite afin de tenir compte d'une éventuelle hydrolyse des peptides pendant le dosage (Tableau IV).

TABLEAU IV
DÉTERMINATION DU N-COOH PAR LA TECHNIQUE À LA NINHYDRINE

Enzyme	Liaisons peptidiques rompues		Aminoacides libérés		$\frac{N-COOH}{N-NH_2} \times 100$
	N-NH ₂ en % du N total	Nb. par mol de protéine en jeu	N-COOH (en % du N total)	Nb. de mol par mol de protéine en jeu	
Pepsine	12.8	99	1.13	8.7	8.8
Trypsine	8.1	63	0.67	5.2	8.3
Chymotrypsine	9.6	74	0.69	5.3	7.2

Les chiffres du Tableau IV sont en bon accord avec la moyenne des chiffres du Tableau I. Tous suggèrent que des aminoacides sont mis en liberté pendant l'hydrolyse endopeptidasique. Dans notre cas particulier, précisons que, sur les 560 restes de la molécule de globine, 5-9 semblent ainsi apparaître à l'état libre et que, sur 100 fonctions NH₂ apparues au cours de l'hydrolyse, 8 environ semblent appartenir à des aminoacides.

B. Etude qualitative et quantitative des aminoacides libres.

1. *Hydrolysats pepsiques*. Après précipitation par l'alcool et dessalage ionophorétique, l'hydrolysate est évaporé à sec et le résidu, dissous dans 2 ml d'acide acétique à 5%, est passé sur une colonne de charbon qui donne un filtrat F₁ et un éluat E₂**. Le résidu d'évaporation de E₂ est repris dans 1 ml d'eau, dont 27 μ l (correspondant à 8.1 mg de protéine), sont soumis à un chromatogramme bidimensionnel (butanol-acide formique puis phénol). Une seule tache d'acide aminé apparaît. Elle possède une intense coloration bleue et elle se trouve située dans la région de la phénylalanine. Aucune tache de tyrosine ne peut être décelée, même sur un chromatogramme monodimensionnel au butanol-acide formique, bien que, dans ces conditions, 3 μ g de tyrosine (0.25 mol par mol de protéine) puissent être vus nettement. En outre, cette même fraction E₂ est traitée par FDNB. Les DNP-dérivés éthersolubles sont passés sur une colonne de chloroforme. On recueille une large bande migrant à la vitesse de la DNP-phénylalanine***. L'hydrolyse de cette bande ne provoque l'apparition d'aucun acide aminé dans la phase hydrosoluble. On peut donc dire que la phénylalanine est le seul représentant des acides aminés aromatiques. Un dosage colorimétrique du DNP-dérivé montre qu'il en existe environ 1 mol par mol de globine. De plus, 36 μ l de la solution obtenue à partir de la fraction F₁ sont appliqués sur papier. Le chromatogramme bidimensionnel révèle l'existence de deux taches principales, l'une à la place de la leucine, l'autre, dans la région de la valine. La tache

* Quand les hydrolyses sont effectuées à p_H alcalin (trypsine et chymotrypsine) les milieux renferment de très grosses quantités de carbonate qui sont éliminées par une ébullition de 5 min à p_H 2.5. Notons en outre, que l'acidification doit se faire par l'acide citrique car l'ion Cl⁻, quand sa concentration est trop forte, provoque une légère erreur par excès (due probablement à la distillation d'un peu de HCl).

** Pour la signification de ces symboles, voir le Chapitre "Techniques".

*** Aucune trace de di-DNP-tyrosine ne peut être décelée à ce stade du fractionnement bien que notre silicagel permette de séparer aisément ce dérivé et la DNP-phénylalanine.

“leucine” est hydrolysée. Sur chromatogramme monodimensionnel (butanol-acide formique), elle fournit une grosse tache de leucine et une autre tache moins importante dans la région de l’alanine. Mais, la technique de SANGER ne permet de caractériser qu’une quantité négligeable de DNP-leucine. Nous sommes donc vraisemblablement en présence d’un peptide de la leucine et de l’alanine, contenant plus de leucine que d’alanine. La tache “valine”, de son côté, se décompose après hydrolyse en de nombreuses taches. Le test à l’isatine, spécifique de la proline²⁸, étant négatif, nous pouvons dire que F_1 est pratiquement dépourvu d’acides aminés libres.

Un témoin effectué avec 10 mg de pepsine ne nous a donné aucune tache visible sur papier. Concluons donc en disant que la phénylalanine est le seul acide aminé libéré en quantités notables pendant l’hydrolyse pepsique de la globine.

2. *Hydrolysats tryptiques*. L’hydrolysat est précipité par l’alcool comme précédemment puis le filtrat est évaporé sous vide dans un exciccateur. Une partie du résidu pesant 29 mg (correspondant à 47 mg de protéine initiale) est extraite par l’acétone, les extraits sont évaporés sous vide à basse température et repris par 0.5 ml d’eau. Un chromatogramme bidimensionnel (butanol-acide formique puis phénol), effectué sur 106 μ l de la solution (correspondant à 9.9 mg de protéine initiale), nous donne deux taches à peine visibles dans la région du glycolle et de la sérine ainsi qu’une tache importante dans la région de la lysine, correspondant à environ 6 μ g de ce dernier acide aminé (0.26 mol par mol de globine). Les réactions de SAKAGUCHI et de PAULI étant négatives, il n’y a ni arginine ni histidine.

Ce même hydrolysat, après précipitation alcoolique, est traité par FDNB. Une forte bande migrant à la vitesse de la di-DNP-lysine se détache sur colonne de chloroforme. Cette bande est identifiée sans équivoque sur colonne glycolbenzène. Sa pureté est en outre vérifiée par hydrolyse. Le dosage colorimétrique donne 0.22 mol de lysine libre par mol de globine. Il n’y a pas de proline par le test à l’isatine et l’enzyme seul ne donne naissance à aucune tache.

Seule la lysine peut donc être identifiée avec certitude dans les hydrolysats tryptiques.

3. *Hydrolysats chymotrypsiques*. Après précipitation alcoolique, le filtrat est évaporé à sec. 65.5 mg du résidu (correspondant à 75 mg de protéine initiale) sont extraits par l’acétone, les extraits sont évaporés sous vide et repris dans 0.5 ml d’eau. Un chromatogramme monodimensionnel (butanol-acide formique) est effectué sur 135 μ l de cette solution (correspondant à 20 mg de la protéine initiale). On voit deux taches très légères et une forte tache, donnant la réaction de SAKAGUCHI, dans la région de l’arginine (0.13 mol environ par mol de globine). Il n’y a pas de proline par le test à l’isatine et la chymotrypsine seule donne des chromatogrammes négatifs. Cet enzyme libère donc de l’arginine en très faibles quantités et aucun autre acide aminé.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Quelques-uns des résultats expérimentaux précédents paraissent mériter un examen particulier:

1. Toutes les opérations réalisées au cours du présent travail ont fait l’objet d’un contrôle attentif. Des essais-témoins ont été effectués qui ont montré, dans la plupart des cas, qu’aucune perte en acides aminés ne pouvait se produire en cours d’opération. Dans les autres cas, ces essais nous ont permis de calculer des coefficients de correction, d’ailleurs faibles, dont nous avons tenu compte au moment des calculs. Malgré ces pré-

cautions, les aminoacides libres décelés par chromatographie dans les hydrolysats endopeptidasiques ne correspondent qu'à une très faible part du N-COOH mesuré selon VAN SLYKE. Dans l'exemple le plus favorable (pepsine), nous avons en effet retrouvé 1 mol d'acide libre par mol de globine, alors que le dosage du N-COOH en indiquait 9. Dans l'exemple le moins favorable (chymotrypsine), le rapport est de 0.13 à 5. Il semble donc bien que l'on ne puisse pas accorder une entière confiance au dosage à la ninhydrine, quand les proportions d'acides libres passent au-dessous d'une certaine limite. Les endopeptidases cristallisées libèrent probablement beaucoup moins d'acides que l'on a l'habitude de le croire.

2. On trouve néanmoins des aminoacides libres en faibles quantités dans les hydrolysats endopeptidasiques. Ces aminoacides ne sont sans doute pas formés par une exopeptidase éventuellement présente dans nos enzymes cristallisées. Songeons en effet que les hydrolyses sont effectuées à des p_H extrêmes (1.8 pour la pepsine; 9.7 pour la trypsine et la chymotrypsine) et que les préparations de pepsine, même brutes, semblent dépourvues d'activité exopeptidasique.

3. Une spécificité très marquée semble se manifester pendant la libération des aminoacides. *Un seul aminoacide libre a pu en effet être identifié dans chaque hydrolysat*: phénylalanine dans les hydrolysats pepsiques, lysine dans les hydrolysats tryptiques et arginine dans les hydrolysats chymotryptiques. Parmi ces aminoacides, on ne trouve jamais la valine, qui occupe pourtant l'extrémité aminée des six chaînes peptidiques de la globine de cheval²⁷.

4. Il ne semble pas toutefois qu'il faille, dès à présent, attribuer trop d'importance à la nature même de l'acide libéré. En effet, nous n'avons encore étudié que l'hydrolyse de la globine de cheval et nous ne savons pas si les faits observés sont imputables à une réelle spécificité des enzymes ou à une simple particularité structurale du substrat protéique. Notons donc sans commentaire que la phénylalanine, trouvée dans les hydrolysats pepsiques, se rencontre également en abondance aux extrémités aminées des peptides⁵. Contrairement aux autres expérimentateurs (qui ont d'ailleurs étudié d'autres hydrolyses), nous n'avons pas identifié la tyrosine parmi les aminoacides libérés par la pepsine. Mais il est clair que la phénylalanine est aussi un acide aromatique dont les peptides servent, comme ceux de la tyrosine, de substrats spécifiques pour cet enzyme¹⁵. De même, on sait que la trypsine hydrolyse les peptides simples de la lysine¹⁵ ainsi que la polylysine²⁸.

Notons par contre que la présence d'arginine n'a jamais encore été constatée dans les molécules simples sensibles à l'action chymotryptique. Mais nous n'avons caractérisé qu'une quantité si faible de ce dernier acide qu'il semble difficile d'ouvrir dès maintenant une discussion à son sujet.

RÉSUMÉ

Au cours du présent travail, nous avons étudié les aminoacides libérés pendant l'hydrolyse de la globine de cheval par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine cristallisées. Les techniques utilisées (dessalage ionophorétique ou par extraction acétonique, chromatographie des aminoacides sur colonnes de charbon ou sur papier, chromatographie des DNP-aminoacides sur silicagel) ont été contrôlées avec le plus grand soin. Toutes les fois qu'une perte sensible a été constatée, un coefficient de correction a pu être calculé. Les résultats obtenus ont été les suivants:

1. Les hydrolysats endopeptidasiques contiennent beaucoup moins d'acides libres que la détermination du N-COOH (ninhydrine) le laisse prévoir.

2. En rapportant chaque fois à 1 mol de globine les quantités molaires d'acides libérés par les trois enzymes, on trouve 1 mol de phénylalanine, 0.25 mol de lysine et 0.1 mol d'arginine, respectivement, dans les hydrolysats pepsique, tryptique et chymotryptique. Chacun de ces hydrolysats ne contient donc qu'un seul acide libre en quantité notable.

SUMMARY

In the course of the present work, we have studied the amino acids liberated during the hydrolysis of horse globin by crystalline pepsin, trypsin and chymotrypsin. The techniques used (ionophoretic desalting or acetone extraction, chromatography of the amino acids on carbon columns or on paper, chromatography of DNP-amino acids on silica gel) have been controlled with great care. Every time a sensible loss has been found, a correction coefficient has been calculated. The results obtained are as follows:

1. The endopeptidasic hydrolysates contain much less free amino acids than the determination of N-COOH (ninhydrin) shows.

2. In relating each time to 1 mol of globin the molar quantities of amino acids liberated by the three enzymes, it is found that the pepsin, trypsin and chymotrypsin hydrolysates contain 1 mol phenylalanine, 0.25 mol lysine, and 0.1 mol arginine, respectively. Each of these hydrolysates contains only one free amino acid in notable quantity.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Aminosäuren untersucht, welche bei der Hydrolyse von Pferde-globin durch kristallisiertes Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin frei werden. Die verwendeten Arbeitsverfahren (ionophoretische oder durch Acetonextraktion bewirkte Entsalzung, Chromatographie der Aminosäuren an einer Säule von Kohle oder auf Papier, Chromatographie der DNP-Aminosäuren an Silicagel) wurden mit der grössten Sorgfalt kontrolliert. Jedesmal wenn ein fühlbarer Verlust festgestellt wurde, konnte ein Korrekturfaktor berechnet werden. Die folgenden Ergebnisse wurde erhalten:

1. Die Endopeptidase-Hydrolysate enthalten viel weniger freie Aminosäuren als die Bestimmung des N-COOH (Ninhydrin) voraussehen lässt.

2. Wenn man die molaren Mengen der durch die drei Enzyme in Freiheit gesetzten Aminosäuren jedesmal auf 1 Mol Globin bezieht, dann findet man resp. 1 Mol Phenylalanin, 0.25 Mol Lysin und 0.1 Mol Arginin, in den peptischen, tryptischen und chymotryptischen Hydrolysaten. Jedes dieser Hydrolysate enthält also nur eine freie Aminosäure.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. D. VAN SLYKE, R. T. DILLON, D. A. McFADYEN ET P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 627.
- ² G. HAUGAARD ET R. M. ROBERTS, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 2664.
- ³ T. WINNICK, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 465.
- ⁴ A. BELOFF ET C. B. ANFENSEN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 863.
- ⁵ P. DESNUELLE, M. ROVERY ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 116.
- ⁶ J. A. V. BUTLER, E. C. DODDS, D. M. P. PHILLIPS ET J. M. L. STEPHEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 122.
- ⁷ J. A. V. BUTLER, E. C. DODDS, D. M. P. PHILLIPS ET J. M. L. STEPHEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 116.
- ⁸ D. B. JONES ET C. E. F. GERSDORFF, *J. Biol. Chem.*, 101 (1933) 657.
- ⁹ K. FELIX, *Z. physiol. Chem.*, 146 (1925) 103.
- ¹⁰ F. LIEBEN ET H. LIEBER, *Biochem. Z.*, 275 (1934) 38.
- ¹¹ H. O. CALVERY ET E. D. SCHOCK, *J. Biol. Chem.*, 113 (1936) 15.
- ¹² I. MORING-CLAESSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 389.
- ¹³ J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930) 739.
- ¹⁴ V. M. INGRAM, *Nature*, 167 (1951) 83.
- ¹⁵ M. BERGMANN ET J. S. FRUTON, *Advances in Enzymol.*, 1 (1941) 63.
- ¹⁶ R. M. HERRIOTT ET J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 18 (1935) 35.
- ¹⁷ S. BLACKBURN, *Biochem. J.*, 47 (1950) 443.
- ¹⁸ M. BERGMANN ET C. NIEMANN, *J. Biol. Chem.*, 118 (1937) 781.
- ¹⁹ M. ROVERY, P. DESNUELLE ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 166.
- ²⁰ C. E. DENT, *Biochem. J.*, 41 (1947) 240.
- ²¹ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- ²² P. BOULANGER ET G. BISERTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 696.
- ²³ CL. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ²⁴ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ²⁵ D. D. VAN SLYKE, R. T. DILLON, D. A. McFADYEN ET P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.
- ²⁶ R. ACHER, CL. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- ²⁷ R. R. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- ²⁸ E. KATCHALSKI, I. GROSSFELD ET M. FRANKEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 2564.

Reçu le 5 Juin 1951