

ÉTUDE DES EXTRÉMITÉS N-TERMINALES DU TRYPSINOGENE ET DE LA TRYPSINE DE BOEUF*

par

M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE

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

Comme suite à notre travail sur le chymotrypsinogène et l' α -chymotrypsine⁴, nous étudions dans la présente note les extrémités N-terminales du trypsinogène et de la trypsine par la technique au fluorodinitrobenzène (FDNB). Tous les résultats sont rapportés à 20,000 g, c'est-à-dire au poids moléculaire minimum de la trypsine^{3,5}.

Pendant la condensation de la trypsine avec FDNB, les risques d'autolyse ont été considérablement réduits en incubant préalablement pendant 2 h la solution trypsique à 0° et pH 7.8 avec DFP (10 mol pour 1 mol) et CaCl₂, en traitant cette solution par FDNB à 0° pendant 2 h et en terminant la condensation dans les conditions habituelles. Les dérivés dinitrophénylés ne sont ni isolés ni lavés. En opérant de cette façon, on trouve plusieurs résidus N-terminaux dans les cristaux de trypsine. Ces résidus sont presque entièrement éliminés — sauf un, qui est l'*isoleucine* — pendant la cristallisation de la DFP-trypsine et le lavage des dérivés dinitrophénylés. Si l'on suppose donc, comme il est d'ailleurs très vraisemblable^{6,7}, que DFP ne se combine pas à un groupe α -NH₂, les cristaux de trypsine contiendraient des impuretés peptidiques^{**}. La protéine elle-même posséderait un résidu *isoleucine* N-terminal^{***}.

Les deux échantillons de trypsinogène, de leur côté, révèlent la présence d'un résidu *valine* N-terminal.

Sous les réserves précédemment mentionnées, ces résultats suggèrent que: a. le trypsinogène et la trypsine renferment chacun une chaîne peptidique ouverte (dans 20,000 g); b. le processus de protéolyse limitée engendrant la trypsine provoque la rupture d'une liaison *isoleucine* dans la chaîne du trypsinogène et le départ de la séquence N-terminale de cette chaîne sous forme d'un ou plusieurs peptides (ou aminoacides). Ce processus serait donc nettement différent de celui qui convertit le chymotrypsinogène en α -chymotrypsine^{4,8}. Notons en outre que les cristaux de trypsine, étudiés comme il est indiqué plus haut, sont presque entièrement dépourvus de *valine* N-terminale. Le peptide contenant ce résidu, libéré au moment de l'activation, se trouve donc probablement dans les eaux de cristallisation de l'enzyme.

* Deux échantillons de trypsinogène sont utilisés dans ce travail. L'un, cristallisé une fois, a été purifié par précipitation trichloracétique¹. L'autre, cristallisé deux fois par Dr F. TIERZE en présence de diisopropylfluorophosphate (DFP), était homogène à la supercentrifugation, inactif vis-à-vis du benzoylarginineéthylester² et activable à 100% par la trypsine. La trypsine a été elle-même cristallisée trois fois selon la méthode classique. Son coefficient d'activité *K* vis-à-vis du benzoylarginineéthylester était 0.32 en présence de CaCl₂. Enfin, une préparation de "DFP-trypsine" a été faite en cristallisant deux fois un échantillon de trypsine commerciale préalablement inhibé par DFP³. Son activité était inférieure à 0.32 · 10⁻³.

L'un de nous a pu préparer certains de ces échantillons au cours d'un voyage effectué aux U.S.A. grâce à la Fondation Rockefeller. Nous sommes heureux de remercier ici très vivement Dr M. KUNITZ, Prof. H. NEURATH et Dr L. CUNNINGHAM de leur hospitalité et de leurs excellents conseils.

** Rappelons que les cristaux d' α -chymotrypsine contiennent aussi des impuretés peptidiques qui sont éliminées, comme dans le cas présent, dès que le centre actif de l'enzyme est bloqué⁴.

*** Une recherche spéciale de la proline n'a pas encore été entreprise.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, Columbia University Press, New York 1948, p. 265.
- ² G. W. SCHWERT, H. NEURATH, S. KAUFMANN ET J. E. SNOKE, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 221.
- ³ E. F. JANSSEN ET A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 721.
- ⁴ P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE, *Compt. Rend.*, 233 (1951) 1496; *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 109.
- ⁵ B. A. KILBY ET G. YOUATT, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 112.
- ⁶ H. FRAENKEL-CONRAT, R. S. BEAN ET H. LINEWEAVER, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 385.
- ⁷ R. F. ASHBOLT ET H. N. RYDON, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 1865.
- ⁸ J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 335.

Reçu le 29 octobre 1952