

## 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' $\alpha$ -chymotrypsine<sup>4</sup>, nous étudions dans la présente note les extrémités N-terminales du trypsinogène et de la trypsin 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 trypsin<sup>3,5</sup>.

Pendant la condensation de la trypsin avec FDNB, les risques d'autolyse ont été considérablement réduits en incubant préalablement pendant 2 h la solution trypsinique à 0° et pH 7,8 avec DFP (10 mol pour 1 mol) et CaCl<sub>2</sub>, 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 trypsin. Ces résidus sont presqu'entièrement éliminés — sauf un, qui est l'isoleucine — pendant la cristallisation de la DFP-trypsin et le lavage des dérivés dinitrophénylés. Si l'on suppose donc, comme il est d'ailleurs très vraisemblable<sup>6,7</sup>, que DFP ne se combine pas à un groupe  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, les cristaux de trypsin contiendraient des impuretés peptidiques<sup>\*\*</sup>. La protéine elle-même possèderait 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 trypsin renferment chacun une chaîne peptidique ouverte (dans 20,000 g); b. le processus de protéolysis limitée engendrant la trypsin 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  $\alpha$ -chymotrypsine<sup>4,8</sup>. Notons en outre que les cristaux de trypsin, étudiés comme il est indiqué plus haut, sont presqu'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 trichloracétique<sup>1</sup>. L'autre, cristallisé deux fois par Dr F. TIETZE en présence de diisopropylfluorophosphate (DFP), était homogène à la supercentrifugation, inactif vis-à-vis du benzoylarginineéthylester<sup>2</sup> et activable à 100% par la trypsin. La trypsin 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 CaCl<sub>2</sub>. Enfin, une préparation de "DFP-trypsin" a été faite en cristallisant deux fois un échantillon de trypsin commerciale préalablement inhibé par DFP<sup>3</sup>. Son activité était inférieure à 0,32 · 10<sup>-3</sup>.

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' $\alpha$ -chymotrypsine contiennent aussi des impuretés peptidiques qui sont éliminées, comme dans le cas présent, dès que le centre actif de l'enzyme est bloqué<sup>4</sup>.

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

### BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. H. NORTHRUP, 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. JANSEN 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. YOUNATT, *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