

En conclusion, alors que, dans les organes où la synthèse des protéines est liée à une multiplication cellulaire, la synthèse de protéines et la vitesse de renouvellement du P de l'ARN semblent liées par un rapport constant (HAMMARSTEN<sup>10</sup>; GRENSON<sup>11</sup>), la situation apparaît toute différente dans le cas de tissus qui ne sont pas le siège de divisions cellulaires: l'ARN peut présenter, dans ces tissus, deux types de comportement très différents. Dans certains d'entre eux, l'ARN subit un renouvellement rapide; c'est ce qui se passe dans le foie non en régénération d'un animal adulte (HAMMARSTEN<sup>10</sup>) et dans les feuilles de tabac ne présentant plus de divisions cellulaires (JEENER<sup>12</sup>). Par contre, dans l'oviducte et le pancréas, le renouvellement du P de l'ARN est très lent, si on le compare à la vitesse de synthèse des protéines. L'apparence d'un lien entre les deux phénomènes étudiés, dans le cas des organes qui sont le siège de divisions cellulaires ne serait que fortuite et pourrait s'expliquer par le fait que, les cellules se multipliant, tous les constituants cellulaires se reproduisent à la même vitesse.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. RABINOVITCH, V. VALERI, H. A. ROTHSCHILD, S. CAMARA, A. SESSO ET L. C. V. JUNQUEIRA, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 815.
- M. DALY ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 243.
- <sup>3</sup> T. CASPERSSON, H. LANDSTRÖM-HYDÉN ET L. AQUILONIUS, *Chromosoma*, 2 (1941) 127.
- <sup>4</sup> E. DE ROBERTIS, *Nature*, 157 (1946) 264.
- <sup>5</sup> P. B. VAN WEEL ET C. ENGEL, *Z. Vergl. Physiol.*, 26 (1938) 67.
- <sup>6</sup> M. GRENSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 102.
- <sup>7</sup> L. E. HOKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 225.
- <sup>8</sup> M. DALE, V. G. ALLFREY ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 173.
- <sup>9</sup> GUBERNIEV ET ILINA, *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, 71 (1950) 351.
- <sup>10</sup> E. HAMMARSTEN, *Isotopes in Biochem.*, Ciba Conf. (1951) 203.
- <sup>11</sup> M. GRENSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 481.
- <sup>12</sup> R. JEENER, *Arch. Intern. Physiol.*, LX 4 (1952) 545.

Received February 5th, 1953

## EXTRÉMITÉS N-TERMINALES DE LA $\beta$ - ET DE LA $\gamma$ -CHYMOTRYPSINES DE BOEUF\*

par

M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE

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

Après avoir conservé des solutions d' $\alpha$ -chymotrypsine à pH = 7.6 et 5° pendant trois semaines, KUNITZ<sup>2</sup> réussit à isoler deux substances cristallines et actives qu'il désigna par les lettres  $\beta$  et  $\gamma$ . L'opinion générale, que nous discutons ci-dessous, est que la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -chymotrypsines doivent leur formation à une autolyse très lente de l' $\alpha$ . S'il en est bien ainsi, une certaine "simplification" de l'enzyme pourrait être réalisée sans altérer pour autant son activité. L'étude de cette autolyse est donc intéressante et nous l'abordons dans la présente note en déterminant comparativement les extrémités N-terminales des trois chymotrypsines.

Les enzymes  $\beta$  et  $\gamma$  ont été cristallisés trois fois<sup>2\*\*</sup>. Agissant sur l'acétyl-L-tyrosine éthylester<sup>3</sup> en solution aqueuse 0.01 M, avec le trishydroxyaminométhane comme tampon pH = 7.9 et à 25°,

\* La deuxième Note de cette série<sup>1</sup> était consacrée à l'étude des extrémités N-terminales du trypsinogène et de la trypsin. Pour éclairer un point laissé jusqu'ici dans l'ombre, signalons que les deux protéines ne possèdent pas de proline N-terminale. Elles renferment donc bien, comme nous le laissons prévoir, une seule chaîne ouverte.

\*\* Nous remercions ici très vivement Dr M. KUNITZ qui a bien voulu nous donner la matière première nécessaire à l'obtention des produits cristallins.

ils libèrent à l'origine 2.1 et 2.2 milli-COOH par min et par mg d'N protéique. Dans les mêmes conditions, l' $\alpha$ -chymotrypsine en libère 2.4. Cette observation confirme celle faite par KUNITZ<sup>2</sup> avec d'autres substrats: Les activités protéolytiques et estérolytique des trois préparations sont tout-à-fait analogues\*. Ces préparations ont ensuite été inhibées par le diisopropylfluorophosphate<sup>4</sup> (DFP), cristallisées deux fois sous forme de dérivés DFP et enfin lyophilisées.

Les résidus N-terminaux ont été déterminés par la technique de SANGER en observant sur le plan quantitatif toutes les prescriptions déjà maintes fois énoncées (Tableau I). Dans ce même tableau, on trouvera à titre de comparaison les résidus N-terminaux de la DFP- $\alpha$ -chymotrypsine<sup>5</sup>. Tous les résultats sont uniformément rapportés à 25,000 g.

Les chiffres du Tableau I montrent clairement que les trois protéines possèdent les mêmes résidus N-terminaux. L'autolyse, si elle existe, n'affecte donc vraisemblablement pas les extrémités N-terminales des chaînes de l' $\alpha$ -chymotrypsine. Elle ne fait pas non plus apparaître de nouvelles chaînes ouvertes.

En outre, les chiffres indiquent que les trois protéines ont des poids moléculaires voisins. Nous confirmons donc les résultats de JANSEN ET BALLS<sup>4</sup> qui, par un dosage de phosphore sur les dérivés DFP, n'ont également pas trouvé de différences notables dans les poids moléculaires. L'idée qui a prévalu pendant longtemps<sup>2</sup>, selon laquelle l' $\alpha$ -chymotrypsine posséderait un poids moléculaire (40,000) bien supérieur à celui de la  $\beta$  (30,000) et de la  $\gamma$  (27,000), doit d'ailleurs être révisée. Le monomère  $\alpha$  pèse en réalité 25,000 g. Toutes les mesures semblent maintenant d'accord pour ce qui concerne l' $\alpha$  et la comparaison de leurs résultats suggère simplement que la  $\beta$  et la  $\gamma$ -chymotrypsines se dimérisent moins facilement que l' $\alpha$ . L'argument principal en faveur d'une autolyse *importante* pendant la conversion  $\alpha \rightarrow \beta$  et  $\gamma$  n'est donc plus valable. Toutes ces considérations n'excluent d'ailleurs pas la possibilité d'une scission de peptides relativement courts sur le côté carboxylique des chaînes.

TABLEAU I

ÉTUDE COMPARÉE DES RÉSIDUS N-TERMINAUX DES DFP- $\alpha$ ,  $\beta$  ET  $\gamma$ -CHYMOTRYPSINES

| Résidus N-terminaux | Nb dans 1 mole de DFP-chymotrypsine |           |            |
|---------------------|-------------------------------------|-----------|------------|
|                     | $\alpha$                            | $\beta^*$ | $\gamma^*$ |
| Alanine             | 0.9                                 | 1.1       | 0.8        |
| Isoleucine          | 0.9                                 | 1.2       | 1.0        |
| Autres résidus      | Néant                               | Néant     | Néant      |

\* Avant d'être inhibés par DFP, les cristaux de  $\beta$  et de  $\gamma$  chymotrypsines, comme d'ailleurs les cristaux d' $\alpha$ , contiennent d'autres résidus terminaux en quantités plus faibles. Ces résidus sont éliminés presque entièrement par la cristallisation des dérivés DFP<sup>5</sup>. Ils appartiennent vraisemblablement à des impuretés peptidiques que la cristallisation des enzymes actifs ne peut pas éliminer.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 702.
- <sup>2</sup> M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 207.
- <sup>3</sup> S. KAUFMAN, H. NEURATH ET G. W. SCHWERT, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 793.
- <sup>4</sup> E. J. JANSEN ET A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 721.
- <sup>5</sup> P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 109.

Reçu le 27 janvier 1953

\* Les faibles différences trouvées par JANSEN ET BALLS<sup>4</sup> avec le tyrosine éthylester et l'hémoglobine comme substrats ne sont sans doute pas très significatives.