

SUR L'OXYDATION DE L'ADRÉNOCHROME

par

DANIÈLE GAUTHERON* ET PAULETTE CHAIN*

Laboratoire de Chimie Physiologique de la Faculté des Sciences de Lyon (France)

L'oxydation *in vitro* de l'adrénaline en solution tampon phosphate et en atmosphère O_2 pur, en présence d'ions Cu^{++} comme catalyseur, se stabilise après fixation de 3 molécules O_2 par molécule d'adrénaline^{1,2}. Cette réaction est associée à une décarboxylation³ et l'étude spectrale montre que l'adrénaline est intermédiairement transformée en adrénochrome⁴. Comme l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome correspond à la fixation de 1 mol. O_2 par molécule d'adrénaline, on est conduit à penser que l'adrénochrome utilisé comme substrat doit fixer 2 mol. O_2 par molécule. Les expériences ci-dessous montrent qu'il en est bien ainsi; en outre, elles mettent en évidence que, en *solution tampon phosphate*:

1. contrairement à l'adrénaline, l'adrénochrome est autoxydable;
2. l'oxydation de l'adrénochrome est légèrement accélérée au début par les ions Cu^{++} ;
3. l'oxydation de l'adrénochrome s'accompagne d'une décarboxylation.

L'adrénochrome est préparé par la méthode à l'oxyde d'argent⁵, à partir de L-adrénaline base, synthétique (Rhône-Poulenc). Il est obtenu à l'état pur après trois cristallisations successives dans du méthanol Merck (pro analysi). Les conditions des mesures (mesures manométriques utilisant l'appareil de WARBURG) ont été antérieurement décrites^{1,2}.

1. *Essais sans addition de cuivre*

L'adrénochrome (conc. $10^{-3} M$) subit une oxydation spontanée qui s'arrête après la fixation de 2 mol. O_2 par molécule (Fig. 1, courbe A). Les résultats sont rigoureusement les mêmes que l'on opère avec de l'adrénochrome ayant subi une ou trois recristallisations, ce qui permet d'exclure une éventuelle catalyse par des traces d'argent subsistant dans le produit. Des essais contenant des ions Ag^+ ($AgNO_3$, $10^{-4} M$ et $10^{-3} M$) montrent d'ailleurs que l'argent non seulement n'a aucune tendance à accélérer l'oxydation de l'adrénochrome mais tendrait plutôt à la ralentir.

2. *Essais après addition de $CuCl_2$*

En présence de quantités équimoléculaires de $CuCl_2$ et d'adrénochrome, la vitesse d'oxydation de l'adrénochrome est quelque peu accrue, mais la réaction s'arrête encore après fixation de 2 mol. $O_2/mol.$ adrénochrome (Fig. 1, courbe B).

3. *Essais sans addition de $CuCl_2$ et sans KOH 20 % dans l'ampoule centrale*

Le dégagement de CO_2 en fin de réaction correspond à environ $\frac{1}{3}$ mol. $CO_2/mol.$ adrénochrome. Il n'est pas possible de mesurer directement la rétention du CO_2 par la solution de phosphate en acidifiant le milieu selon la méthode classique; en effet, l'acidification du milieu décompose l'adrénochrome instantanément. Toutefois, on peut déterminer indirectement cette rétention par des mesures du CO_2 dégagé à partir de solutions étalons de bicarbonate introduites dans la solution tampon. On peut alors calculer que, dans nos expériences, il se forme 1 mol. de CO_2 par mol. d'adrénochrome.

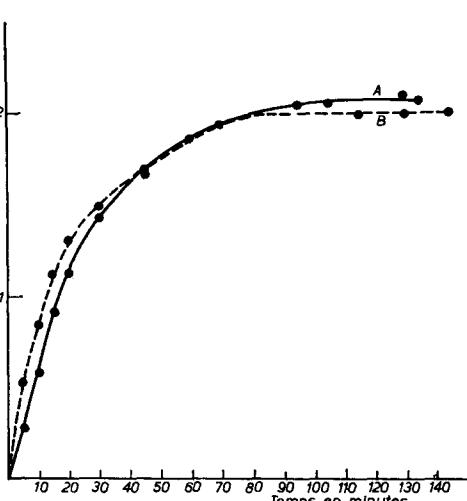


Fig. 1. Influence des ions Cu^{++} sur la vitesse d'oxydation de l'adrénochrome $10^{-3} M$ en solution tampon phosphate K_2HPO_4 $0.2 M$. Adrénochrome $10^{-3} M$. Atmosphère O_2 pur. Température 37° . pH 7.3. A = essai sans $CuCl_2$; B = essai en présence de $CuCl_2$ $10^{-3} M$

4. *Expériences en solution tampon bicarbonate*

Signalons enfin que l'adrénochrome en solution tampon bicarbonate Na 0.03 M et atmosphère

* Adresse actuelle: Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris.

(O₂ + 5% CO₂) à 37° et pH 7.3 ne subit pas d'oxydation pendant 2 heures au moins, résultat qui laissait prévoir la stabilisation de l'oxydation de l'adrénaline dans les mêmes conditions, au stade adrénochrome.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. CHAIX, J. CHAUVEAU ET J. JEZEQUEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 471.
- ² P. CHAIX, G. A. MORIN ET J. JEZEQUEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 472.
- ³ P. CHAIX ET C. PALLAGET, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 462.
- ⁴ P. CHAIX ET D. GAUTHERON, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 405.
- ⁵ W. L. C. VEER, *Rec. Trav. Chim.*, 61 (1942) 638.

Reçu le 16 décembre 1953

SUR L'EXISTENCE PROBABLE D'UNE CHYMOTRYPNSINE DÉPOURVUE D'ALANINE N-TERMINALE

par

M. ROVERY ET P. DESNUELLE

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

Le chymotrypsinogène de bœuf, qui possède vraisemblablement une structure cyclique¹, donne naissance à la chymotrypsine-*α* sous l'influence d'une faible quantité de trypsine². Après inhibition par le diisopropylfluorophosphate et plusieurs cristallisations à l'état inactif, cette chymotrypsine renferme deux résidus N-terminaux par mole (isoleucine et alanine^{3,4}) et deux résidus C-terminaux⁵. L'activation semble donc résulter de l'ouverture de un ou deux cycles dans le chymotrypsinogène, formant un enzyme avec deux chaînes peptidiques ouvertes^{4,5,6}.

JACOBSEN⁷ a toutefois suggéré que la chymotrypsine-*α* n'est pas le seul enzyme susceptible d'être engendré par le chymotrypsinogène. L'enzyme primaire (chymotrypsine-*π*) serait très actif (2 à 2.5 fois plus actif que l'*α*), mais aussi très instable. En présence de beaucoup de trypsine (activation rapide de JACOBSEN), une deuxième hydrolyse trypsique le convertirait en chymotrypsine-*δ* (1.5 fois plus active que l'*α*). Dans le cas contraire (activation lente de KUNZITZ ET NORTHRUP), il s'autolyserait ou se dégraderait spontanément en donnant la chymotrypsine-*α*. Les arguments directs en faveur de l'existence de ces deux nouvelles chymotrypsines, sont d'ailleurs encore rares. Néanmoins, JACOBSEN, en activant rapidement le chymotrypsinogène, n'a pu obtenir qu'une quantité très faible de chymotrypsine-*α* cristallisée. D'autre part, la constante d'affinité (vis-à-vis de l'acétyl-L-tyrosine éthylester) du ou des enzymes formés dans les conditions préconisées par cet auteur, semble nettement supérieure à celle de l'enzyme *α*. Enfin, la nature des résidus C-terminaux de ce dernier enzyme fait penser que l'hydrolyse trypsique n'est pas seule en cause pendant sa formation^{5*}.

Postulant que plusieurs protéines différentes sont douées, à des degrés divers, d'une activité chymotrypsique commune, la théorie de JACOBSEN est extrêmement séduisante. Nous avons donc cherché à savoir si la structure des protéines engendrées au cours de l'activation du chymotrypsinogène est réellement fonction des quantités de trypsine en jeu et, dans ce but, nous avons étudié les résidus N-terminaux de quelques hydrolysats.

Afin d'éviter toute protéolyse ultérieure, les liquides activés** sont additionnés de diisopropyl fluorophosphate (10 mole par mole de zymogène). Après 15 min dans la glace, ces liquides sont amenés à pH 6, portés 10 min dans un bain-marie bouillant, puis condensés avec le fluorodinitrobenzène 2 h à 0° et 2 h à la température ordinaire. Les dérivés dinitrophénylés sont soigneusement lavés à l'eau, l'alcool et l'éther, afin d'éliminer les peptides dans toute la mesure du possible. Traitée de cette façon, la chymotrypsine-*α* engendre comme d'habitude^{3,4} 1 mole de DNP-isoleucine et 0.8 mole d'alanine. Le Tableau I donne les résultats.

* JACOBSEN avait cru en outre démontrer que les chymotrypsines *π*, *δ* et *α* se forment par rupture de 1, 2 et 4 liaisons peptidiques dans 1 mole de chymotrypsinogène pesant 36,000 g. Mais, depuis que l'on attribue à cette protéine un poids moléculaire notablement plus faible (22,500 environ), la validité de ces chiffres, celle du premier en particulier, doit être remise en question.

** Quand les liquides contiennent du sulfate d'ammonium, leur fraction protéique est isolée par précipitation trichloracétique avant le traitement au fluorodinitrobenzène.