

( $O_2 + 5\% CO_2$ ) à  $37^\circ$  et pH 7.3 ne subit pas d'oxydation pendant 2 heures au moins, résultat que laissait prévoir la stabilisation de l'oxydation de l'adrénaline dans les mêmes conditions, au stade adrénochrome.

## BIBLIOGRAPHIE

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

Reçu le 16 décembre 1953

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

par

M. ROVERY ET P. DESNUELLE

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

Le chymotrypsinogène de boeuf, qui possède vraisemblablement une structure cyclique<sup>1</sup>, donne naissance à la chymotrypsine- $\alpha$  sous l'influence d'une faible quantité de trypsine<sup>2</sup>. Après inhibition par le diisopropylfluorophosphate et plusieurs cristallisations à l'état inactif, cette chymotrypsine renferme deux résidus N-terminaux par mole (isoleucine et alanine<sup>3,4</sup>) et deux résidus C-terminaux<sup>5</sup>. L'activation semble donc résulter de l'ouverture de un ou deux cycles dans le chymotrypsinogène, formant un enzyme avec deux chaînes peptidiques ouvertes<sup>4,5,6</sup>.

JACOBSEN<sup>7</sup> a toutefois suggéré que la chymotrypsine- $\alpha$  n'est pas le seul enzyme susceptible d'être engendré par le chymotrypsinogène. L'enzyme primaire (chymotrypsine- $\pi$ ) serait très actif (2 à 2.5 fois plus actif que l' $\alpha$ ), mais aussi très instable. En présence de beaucoup de trypsine (activation rapide de JACOBSEN), une deuxième hydrolyse trypsique le convertirait en chymotrypsine- $\delta$  (1.5 fois plus active que l' $\alpha$ ). Dans le cas contraire (activation lente de KUNITZ ET NORTHROP), il s'autolyserait ou se dégraderait spontanément en donnant la chymotrypsine- $\alpha$ . 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- $\alpha$  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  $\alpha$ <sup>8</sup>. 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<sup>5\*</sup>.

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  $0^\circ$  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- $\alpha$  engendre comme d'habitude<sup>3,4</sup> 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  $\pi$ ,  $\delta$  et  $\alpha$  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.

TABLEAU I

## ÉTUDE DE DIVERS HYDROLYSATS DE CHYMOTRYPSINOÈNE

Toutes les hydrolyses sont effectuées à 0° et pH 7.2. Les concentrations sont données en g par 100 ml.

|                                     | Activation rapide<br>de JACOBSEN |       | Activation lente                     |        |                                      |        |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------|--------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
|                                     |                                  |       | Sans SO <sub>4</sub> Am <sub>2</sub> |        | Avec SO <sub>4</sub> Am <sub>2</sub> |        |
|                                     | 1                                | 2     | 3                                    | 4      | 5                                    | 6      |
| Conditions d'activation             |                                  |       |                                      |        |                                      |        |
| Concentration en                    |                                  |       |                                      |        |                                      |        |
| { Chymotrypsinogène                 | 2.4                              | 2.4   | 4.6                                  | 4.6    | 4.6                                  | 10     |
| { Trypsine                          | 0.062                            | 0.062 | 0.005                                | 0.0025 | 0.0025                               | 0.0003 |
| { SO <sub>4</sub> Am <sub>2</sub>   | 0                                | 0     | 0                                    | 0      | 1.5                                  | 3.6    |
| Durée de l'hydrolyse en h.          | 1/2                              | 1     | 40                                   | 40     | 40                                   | 48     |
| Activité spécifique des hydrolysats |                                  |       |                                      |        |                                      |        |
| (acétyl-L-tyrosine éthylester)      | 3.7                              | 4.1 * | —                                    | —      | 2.8                                  | 1.5    |
| Résidus N-terminaux                 |                                  |       |                                      |        |                                      |        |
| (pour 22,500 g)                     |                                  |       |                                      |        |                                      |        |
| Isoleucine                          | 0.9                              | 1.0   | 1.1                                  | 1.3    | 1.2                                  | 0.5    |
| Alanine                             | 0.06                             | # 0   | 0.2                                  | 0.3    | 0.5                                  | 1.2    |
| Thréonine                           | 0.2                              | 0.3   | 0.3                                  | 0.4    | # 0                                  | 0.1    |
| Autres résidus                      | 0.0                              | 0.0   | 0.0                                  | 0.0    | 0.0                                  | 0.0    |

\* Cette valeur correspond au maximum d'activité susceptible d'être obtenu dans ces conditions.

Les résultats de ce tableau, obtenus avec des mélanges manifestement hétérogènes, n'ont qu'un caractère préliminaire. Ils montrent cependant, dès maintenant, que :

1. L'acétyl-L-tyrosine éthylester est rapidement hydrolysé par des liquides (essais (1) et (2)) dont aucun constituant protéique ne contient d'alanine N-terminale. La présence de ce résidu, et toute la structure qu'elle implique, ne sont donc pas indispensables à l'activité chymotrypsique. Par contre, tous les liquides actifs contiennent de grosses quantités d'isoleucine N-terminale. On peut donc imaginer, à titre d'hypothèse de travail, que l'une des chymotrypsines de JACOBSEN possède une unique chaîne ouverte et représente ainsi un stade intermédiaire dans la conversion du chymotrypsinogène en chymotrypsine- $\alpha$ . Quoi qu'il en soit, l'isoleucine N-terminale, qui se rencontre aussi dans les chymotrypsines- $\beta$  et  $\gamma$ <sup>9</sup> ainsi que dans la trypsine<sup>10</sup>, semble représenter un élément structural commun à toutes les endopeptidases pancréatiques étudiées jusqu'ici.

2. Les liquides actifs possèdent d'autant plus d'alanine N-terminale que les quantités de trypsine utilisées sont plus faibles. Ce fait est évidemment compatible avec l'idée que l'alanine N-terminale (et par conséquent la chymotrypsine- $\alpha$ ) est engendrée au cours de l'auto-dégradation d'une chymotrypsine primaire instable.

3. Comme JACOBSEN<sup>7</sup> et SCHWERT<sup>8</sup> l'ont déjà noté, on obtient une plus grande activité spécifique en activant rapidement le chymotrypsinogène qu'en l'activant lentement. Il est donc probable que l'apparition de la structure correspondant à l'alanine N-terminale, diminue l'activité chymotrypsique.

L'interprétation qu'il convient de donner à la thréonine N-terminale sera discutée ultérieurement.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1496.
- <sup>2</sup> M. KUNITZ ET J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1936) 991.
- <sup>3</sup> P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 109.
- <sup>4</sup> M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.
- <sup>5</sup> J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 335; *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 345.
- <sup>6</sup> P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Ciba Conference on Protein Structure*, London 1952 (sous presse).
- <sup>7</sup> C. F. JACOBSEN, *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, Série chim.*, 25 (1947) 325.
- <sup>8</sup> G. W. SCHWERT ET S. KAUFMAN, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 517.
- <sup>9</sup> M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 481.
- <sup>10</sup> M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 702.

Reçu le 30 décembre 1953