

SUR LES PROTÉOLYSES LIMITÉES
PROVOQUANT L'ACTIVATION DU CHYMOTRYPSINOGENE

par

M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE

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

Les travaux désormais classiques de NORTHROP ET KUNITZ¹ nous ont appris qu'une protéine du pancréas (le chymotrypsinogène) est susceptible de se convertir en un enzyme protéolytique (la chymotrypsine- α) sous l'influence de la trypsine. L'hypothèse la plus simple consiste évidemment à supposer que la trypsine rompt au sein du chymotrypsinogène certaines liaisons peptidiques et que ces ruptures déterminent les modifications de structure nécessaires à l'apparition de l'activité enzymatique. Bien que NORTHROP ET KUNITZ aient hésité à la formuler d'une façon aussi nette, cette hypothèse est vraisemblablement exacte car l'enzyme- α possède par rapport à son zymogène deux résidus N-terminaux (*isoleucine* et *alanine*^{2,3}) et deux résidus C-terminaux (*leucine* et *tyrosine*⁴) supplémentaires.

La préparation de la chymotrypsine- α exige que l'on traite le zymogène par une très faible quantité de trypsine (activation lente). En 1949, JACOBSEN⁵ eut l'idée d'utiliser des quantités de trypsine plus fortes (activation rapide) et il obtint des liquides dont le pouvoir coagulant vis à vis du lait était très notablement supérieur à celui de la chymotrypsine- α cristallisée. Des études très complètes sur la cinétique de l'activation lente et de l'activation rapide amenèrent d'autre part l'auteur à supposer que la trypsine convertit le chymotrypsinogène en un enzyme primaire instable, la chymotrypsine- π , dont le destin ultérieur est réglé par les quantités de trypsine utilisées pendant l'activation. De fortes quantités la transformeraient par une dégradation ultérieure en un nouvel enzyme, la chymotrypsine- δ . Des quantités plus faibles ne pourraient pas l'attaquer et l'enzyme- π aurait alors le temps de s'autolyser peu à peu en engendrant l'enzyme- α . Nous verrons plus loin que penser de cette interprétation. Mais le fait expérimental demeure : Le chymotrypsinogène est capable d'engendrer plusieurs chymotrypsines douées d'une activité plus ou moins grande. Ces chymotrypsines doivent être pour une large part identiques puisqu'elles proviennent d'une même protéine-mère. Mais leur structure doit malgré tout présenter quelques différences, lesquelles influent sur l'activité. Il est à peine besoin de souligner l'intérêt qui s'attache à l'étude d'un tel phénomène.

Trois notes préliminaires⁶⁻⁸ émanant de ce Laboratoire ont déjà apporté quelques lumières sur le mode de formation des chymotrypsines de JACOBSEN et par conséquent sur le mécanisme fondamental de l'activation du chymotrypsinogène. L'objet du présent mémoire est de décrire nos expériences et d'en discuter les résultats avec ceux publiés indépendamment par NEURATH et ses collaborateurs^{9,10}.

I. SÉQUENCE N-TERMINALE DES CHYMOTRYPSINES α ET δ^*

Nous avons d'abord cherché à savoir par un moyen simple si les chymotrypsines de JACOBSEN et la chymotrypsine- α ont réellement une structure différente. Dans ce but, nous avons déterminé les résidus N-terminaux apparaissant pendant l'activation rapide et l'activation lente du chymotrypsinogène.

Du chymotrypsinogène de bœuf cristallisé 5 fois est activé pendant des temps variables par des quantités différentes de trypsin à 0° et pH = 7.6. Une partie aliquote des solutions sert à la détermination de l'activité estérasique. L'autre partie est traitée par 5 fois la quantité stoechiométrique de DFP afin de stabiliser la structure des protéines formées. Après 15 min d'incubation à 0°, on ajoute une solution alcoolique de FDNB et de la triméthylamine. On agite à l'obscurité pendant 2 h, on extrait la solution aqueuse avec de l'éther et on évapore sous vide à l'obscurité. On transfère le résidu sec dans un tube de centrifugeuse en s'aident d'un peu de HCl N et on le lave avec HCl N jusqu'à ce que les extraits ne soient plus colorés (extrait E₁). On procède de même avec l'acétate d'éthyle (E₂), la méthyléthylcétone (E₃), le n-butanol (E₄) et le bicarbonate à 1% (E₅). Ces extraits seront étudiés dans le paragraphe consacré aux DNP-peptides (voir plus loin). Le résidu final de DNP-protéines est lavé par de l'eau, de l'alcool et de l'éther puis il est hydrolysé pendant 18 h dans HCl 5.6 N à reflux. L'extrait éthérisé de l'hydrolysat est analysé au moyen de colonnes de silicagel tamponné. Chaque bande jaune est recueillie à part, évaporée à sec, dissoute dans HCl N et dosée spectrophotométriquement à 3500 Å. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont réunis dans le Tableau I.

TABLEAU I

RÉSIDUS N-TERMINAUX APPARAISANT PENDANT L'ACTIVATION DU CHYMOTRYPSINOGENE DE BOEUF
Les résidus N-terminaux sont donnés en mole par mole de chymotrypsinogène (22,500 g)

	Activation "rapide"				Activation "lente"			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Conditions d'activation								
Durée du traitement (h)	1/6	1/2	1	3	40	40	40	48
Concentrations (mole par litre) en								
chymotrypsinogène ($\times 10^{-4}$)	10.6	10.6	10.6	10.6	20.4	20.4	20.4	44.3
trypsin ($\times 10^{-4}$)	0.26	0.26	0.26	0.26	0.022	0.011	0.011	0.001
Am ₂ SO ₄	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.27
Activité spécifique des solutions*	3.7	4.1	3.9	3.8	—	3.2	2.8	1.5
Résidus N-terminaux apparus** dans la fraction protéique								
isoLeucine	1.00	0.95	0.95	0.95	1.1	1.1	1.2	0.5
NDNP-isoLeucine	0.64	0.52	0.65	0.65	0.8	0.8	0.9	0.4
NDNP-isoLeucylvaline	0.36	0.43	0.30	0.30	0.3	0.3	0.3	0.1
Alanine	0.0	# 0	# 0	# 0	0.2	0.2	0.5	1.2
Thrénanine	—	0.1	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	0.0	0.0

* La chymotrypsine- α cristallisée 5 fois possède dans nos conditions expérimentales une activité spécifique de 2.4.

** Les préparations contiennent également le résidu N-terminal de $\frac{1}{2}$ cystine décelé par BETTELHEIM¹⁹ dans le chymotrypsinogène. Ce tableau et le Tableau II ne mentionnent que les résidus nouveaux apparaissant pendant l'activation.

* Les abréviations suivantes sont utilisées: DFP: diisopropylfluorophosphate; DIP-chymotrypsine: chymotrypsine sélectivement inhibée par un radical diisopropylphosphoryle; FDNB: Fluorodinitrobenzène; DNP: radical dinitrophényle.

Bibliographie p. 578.

Les chiffres du Tableau I méritent d'être commentés comme suit:

1. Le processus d'activation du chymotrypsinogène fait apparaître dans tous les cas un résidu N-terminal d'*isoleucine*. Ce résidu se rencontre partiellement sous forme de DNP-*isoleucylvaline* dont la stabilité est due au voisinage de deux résidus encombrants. Toutes les endopeptidases pancréatiques (chymotrypsines de JACOBSEN, chymotrypsines α^3 , β et γ^{11} , trypsine^{12,13}) possèdent donc la même séquence N-terminale. Le rapprochement est intéressant bien qu'il ne signifie pas forcément que la séquence *isoleucylvaline* participe à l'édification du centre actif des enzymes. La pepsine possède également un résidu N-terminal d'*isoleucine*, suivi il est vrai d'un résidu de glycocolle¹⁴.

2. Les enzymes formés au cours de l'activation rapide sont dépourvus d'alanine N-terminale. Leur structure est donc différente de celle de la chymotrypsine- α . L'apparition de l'alanine N-terminale n'est pas indispensable à l'activité chymotrypsique. Bien au contraire, elle semble coïncider avec une diminution dans la capacité d'activation du zymogène. Ces faits confirment et précisent les idées de JACOBSEN. Il est évident que l'alanine N-terminale doit sa formation au processus somme toute secondaire engendrant l'enzyme- α .

3. Le fait de trouver plus d'alanine N-terminale dans l'essai 8 que dans l'essai 7, alors que la vitesse du processus d'activation est considérablement plus faible, est enfin compatible avec la suggestion de NEURATH et coll.^{9,10}, d'après laquelle la protéolyse supplémentaire engendrant l'enzyme- α serait due à une attaque du chymotrypsinogène par la chymotrypsine- π ou δ . Avant d'être tenue définitivement pour exacte, cette suggestion intéressante doit toutefois faire l'objet de contrôles expérimentaux sérieux.

II. RÉSIDU C-TERMINAL DE LA CHYMOTRYPSINE- δ

Si, comme on peut le penser, les chymotrypsines de JACOBSEN se forment grâce à une protéolyse limitée du chymotrypsinogène, à l'apparition du résidu N-terminal d'*isoleucine* doit correspondre l'apparition d'un résidu C-terminal nouveau. Ce résidu a été étudié au moyen de la carboxypeptidase que nous avons fait agir, pour plus de sûreté*, non pas sur les mélanges relativement complexes engendrés par l'activation rapide, mais sur une préparation préalablement purifiée par cristallisation. Voici un exemple typique de notre technique de cristallisation:

2 g de chymotrypsinogène 5 fois cristallisés et lyophilisés sont activés dans des conditions déjà décrites (Tableau I, colonne 2). La solution obtenue (activité spécifique: 4.0) est additionnée de 5 mole de DFP par mole de zymogène. Au bout de 1 h à 0°, l'activité spécifique est tombée à $0.16 \cdot 10^{-2}$. On précipite alors les protéines dans Am_2SO_4 0.7 S. On essore le gâteau (12 g) et on le dissout dans 9 ml de H_2SO_4 N/100. On clarifie la solution par centrifugation à 10,000 g et on ajoute une solution saturée de Am_2SO_4 jusqu'à ce qu'un trouble léger et persistant se forme. Cet ajout est nettement inférieur à celui que l'on effectue pendant la cristallisation de la DIP-chymotrypsine- α ¹⁵. Après 24 h de repos à la température ordinaire, on note la présence de moires qui indique un début de cristallisation. On laisse la cristallisation se poursuivre pendant 24 h. On essore les cristaux (6.0 g) et on les dissout dans 9 ml de H_2SO_4 N/100. On clarifie la solution par centrifugation et on l'additionne de Am_2SO_4 saturé jusqu'à formation du premier trouble. La cristallisation est cette fois terminée au bout de 12 h. Après trois nouvelles cristallisations, on dialyse la dernière solution contre HCl N/1000 et on lyophilise. Le rendement global (5 cristallisations) est environ 20-25%.

On détermine sur cette préparation la teneur en phosphore¹⁶, les résidus N-terminaux et les résidus C-terminaux. Pour étudier ces derniers, on dissout la préparation (0.71 μ -mole) dans de l'eau, on amène le pH à 7.7 avec de la soude, on ajoute 0.1 ml d'une solution de carboxypeptidase (0.022 μ -mole) dans LiCl à 10% préalablement incubée à pH = 7.7 avec 0.07 μ -mole de DFP et on amène

* Déjà avec des protéines pures, la technique à la carboxypeptidase donne des résultats quelquefois ambigus. Il n'est donc pas très rationnel de faire agir cet enzyme sur un mélange.

le volume final à 1 ml. Après 3 ou 5 h à 25°, on prélève 0.4 ml de la solution, on lui ajoute 66 mg de Zeokarb 225 forme H¹⁸ et on agite pendant 1 h. On lave abondamment la résine à l'eau distillée et on élue les aminoacides en agitant 2 fois pendant 15 min avec 0.4 ml d'ammoniaque N. Chaque élution est suivie d'un lavage par 0.3 ml d'eau. Les extraits sont évaporés à sec, repris par l'eau et chromatographiés sur papier. Dans ces conditions, tous les aminoacides, sauf la lysine et l'arginine, sont récupérés quantitativement. La récupération de la lysine est importante mais incomplète. L'arginine n'est pas du tout élue par l'ammoniaque N ou 5 N.

TABLEAU II

ANALYSE DE LA CHYMOTRYPSINE- δ CRISTALLISÉE

	Nb. d'atomes ou de résidus par mole (22,500 g)
Phosphore	0.92-1.04
Résidus N-terminaux*	
<i>iso</i> Leucine	0.82
DNP- <i>iso</i> leucine	0.67
DNP- <i>iso</i> leucylvaline	0.15
Alanine	Néant
Thrénanine	Néant
Résidus C-terminaux	
Leucine	0.8
Tyrosine	Néant

* Voir la note** du Tableau I.

Le Tableau II indique les résultats obtenus au moyen de toutes ces techniques.

Les remarques suivantes peuvent être faites à propos des chiffres du Tableau II:

1. La présence de 1 atome de phosphore par mole montre que la préparation étudiée est bien une chymotrypsine sélectivement inhibée par un radical diisopropylphosphoryle. Le rendement élevé de la cristallisation et la grande activité des solutions initiales ne laissaient d'ailleurs aucun doute à ce sujet.

2. La préparation contient évidemment un résidu N-terminal d'*iso*leucine par mole puisque le mélange protéique dont elle est issue renferme lui-même un résidu de cet aminoacide.

3. Après 3 ou 5 h d'incubation avec la carboxypeptidase, on obtient sur le papier une seule tache significative (0.8 mole par mole de zymogène) dont la position correspond à celle de la leucine. On peut donc penser que la préparation contient, soit un unique résidu C-terminal de leucine, soit en plus d'autres résidus C-terminaux non-réactifs vis à vis de la carboxypeptidase. L'arginine, en admettant même qu'elle soit partiellement libérée par cet enzyme, ne saurait d'ailleurs être décolée puisqu'elle est retenue de façon irréversible par la résine. Toutefois, il est permis de croire que la tyrosine C-terminale de la chymotrypsine- α est totalement absente. Nous nous trouvons donc dans une situation analogue à celle de tout à l'heure: L'activation rapide engendre un seul des deux résidus N-terminaux de l'activation lente (*l'iso*leucine sans lalanine) et aussi un seul de ses deux résidus C-terminaux (la leucine sans la tyrosine).

C'est d'ailleurs l'un des avantages principaux de la cristallisation que d'éliminer entièrement la tyrosine C-terminale ainsi que les traces d'alanine et de thrénanine N-terminales contenues par les protéines brutes (Tableau I, colonne 2)*. Nous pouvons

* Agissant sur une solution de chymotrypsinogène activé pendant 2 h, la carboxypeptidase libère 1.3 résidus de leucine, 0.3 résidu de tyrosine et 0.3 résidu de glycocolle⁹.

Bibliographie p. 578.

donc classer sans la moindre ambiguïté les résidus terminaux en 2 groupes: Le groupe secondaire alanine-tyrosine qui apparaît pendant l'activation lente seulement; le groupe *isoleucine-leucine* sur lequel nous allons désormais concentrer notre attention.

4. Etant donné que l'activation du chymotrypsinogène est effectuée par la trypsine, on pourrait s'étonner de ne pas trouver dans les diverses chymotrypsines un résidu C-terminal basique. Comme nous venons de le voir, cet étonnement ne serait pas justifié. La spécificité de la carboxypeptidase et l'adsorption irréversible de l'arginine sur la résine nous enlèvent *a priori* tout espoir de déceler ce résidu. Néanmoins, la présence d'un résidu C-terminal de leucine mérite d'être discutée car, étant en désaccord avec ce que l'on sait de la spécificité de la trypsine, elle suggère que notre chymotrypsine n'est pas la première à se former pendant l'activation rapide. Autrement dit, les techniques des groupements terminaux apportent deux arguments expérimentaux à l'appui de la théorie de JACOBSEN: (a) les chymotrypsines de l'activation rapide sont sûrement différentes de la chymotrypsine- α ; (b) selon toute vraisemblance, cette activation engendre bien successivement deux chymotrypsines, la chymotrypsine- π avec un résidu C-terminal basique et la chymotrypsine- δ avec un résidu C-terminal de leucine. En outre, la nature même des résidus terminaux permet de formuler, comme nous l'avons fait dans l'une de nos notes préliminaires⁷, l'hypothèse de travail suivante: (a) La conversion chymotrypsinogène → chymotrypsine- π (et par conséquent l'apparition de l'activité chymotrypsique) sont dues à la rupture d'une liaison base-*isoleucine* par la trypsine au sein du zymogène; (b) l'enzyme- π se convertit ultérieurement en enzyme- δ grâce à la rupture d'une liaison leucyl-X et à l'ablation d'un peptide X-base*; (c) La formation de l'enzyme- α exige d'autres ruptures protéolytiques qui ne sont pas reliées directement au processus d'activation. Les éléments (a) et (b) de cette hypothèse ont été pleinement confirmés par l'identification du peptide X-base (voir le chapitre suivant et les ref. 8 et 10) ainsi que par les expériences fort élégantes de BETTELHEIM ET NEURATH^{9**}. Ces auteurs ont réussi en outre à montrer que la conversion de l'enzyme- π en enzyme- δ est due à une autolyse (et non pas à une nouvelle attaque trypsique comme le pensait JACOBSEN) puisqu'elle est retardée quand on inhibe la chymotrypsine par le β -phényl-propionate (et non pas quand on inhibe la trypsine par son inhibiteur spécifique du soja). On trouvera dans le chapitre suivant le détail de nos propres expériences à ce sujet.

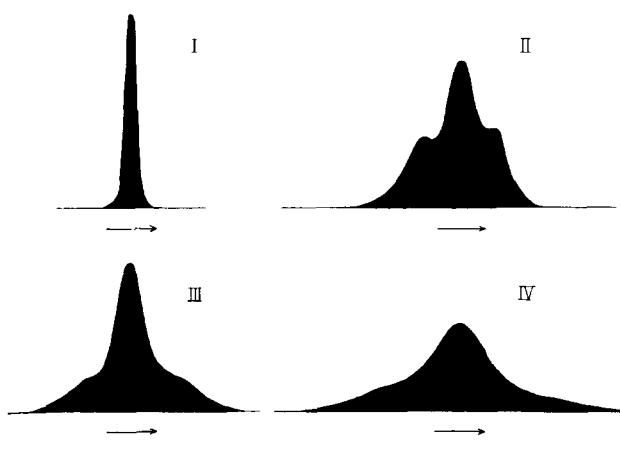
5. Le principal objet de nos essais de cristallisation n'était pas d'obtenir une protéine pure mais plutôt une préparation suffisamment purifiée pour que l'étude de ses résidus terminaux ne présente aucune ambiguïté. Il est cependant utile de signaler que cette préparation n'est pas homogène à l'électrophorèse (Fig. 1). Elle ne peut pourtant contenir ni chymotrypsinogène (puisque elle n'est pas activable par la trypsine), ni chymotrypsine- π (puisque elle possède autant de leucine C-terminale que d'*isoleucine N-terminale*) ni chymotrypsine- α (puisque elle est complètement dépourvue d'alanine et de tyrosine terminales) ni enfin d'autres protéines inertes (puisque elle contient 1 atome de

* GLADNER ET NEURATH⁴ avaient déjà pensé qu'un résidu C-terminal basique devait à un moment donné être remplacé par un résidu non-basique grâce à l'ablation d'un peptide. Mais les auteurs avaient admis que ce remplacement a lieu quand l'enzyme- π se convertit en enzyme- α . C'est l'identification d'un résidu C-terminal de leucine dans l'une des chymotrypsines de l'activation rapide qui nous a conduits à modifier cette conception.

** Grâce à l'étude des diagrammes électrophorétiques des chymotrypsines de l'activation rapide et à la détermination des résidus terminaux, les auteurs sont arrivés en effet par des voies expérimentales différentes, à des conclusions identiques aux nôtres.

phosphore par mole). Si l'on en croit les tests chimiques, elle représente donc une protéine pure, la chymotrypsine- δ . Elle renferme néanmoins trois constituants dont la mobilité électrophorétique est nettement différente. BETTELHEIM ET NEURATH⁹ semblent avoir obtenu sans difficulté des pics à peu près symétriques pour les chymotrypsines α et δ , en soumettant à l'électrophorèse dans des conditions de pH et de durée analogues aux nôtres les protéines brutes engendrées par l'activation rapide. Peut-être faut-il donc penser que l'hétérogénéité provient de la préparation des dérivés DIP ou de la cristallisation. On sait que la DIP-chymotrypsine- α (réf. 20 et Fig. 1), la DIP-chymotrypsine- γ (Fig. 1) et la DIP-trypsine²¹ sont elles-mêmes hétérogènes à l'électrophorèse.

Fig. 1. *Electrophorèse du chymotrypsinogène et des dérivés DIP de diverses chymotrypsines.* Toutes les électrophorèses sont réalisées à 3 dans des tampons acétate, $\mu = 0.1$. Les diagrammes sont relatifs aux frontières ascendantes. I. Chymotrypsinogène 8 fois cristallisé et lyophilisé, pH = 4.50, gradient de potentiel: 6.94 volt cm⁻¹, durée: 19,020 sec. II. DIP-chymotrypsine- δ préparée comme il est indiqué dans le texte, pH = 4.85, gradient de potentiel: 7.0 volt cm⁻¹, durée: 15,000 sec. III. DIP-chymotrypsine- α préparée à partir de chymotrypsine- α cristallisée 5 fois et elle-même cristallisée 3 fois puis lyophilisée, pH = 4.40, gradient de potentiel: 6.80 volt cm⁻¹, durée: 16,000 sec. IV. DIP-chymotrypsine- γ préparée à partir de chymotrypsine- γ cristallisée 4 fois et elle-même cristallisée 3 fois puis lyophilisée, pH = 4.55, gradient de potentiel 6.9 volt cm⁻¹, durée: 16,000 sec.



électrophorèses sont réalisées à 3 dans des tampons acétate, $\mu = 0.1$. Les diagrammes sont relatifs aux frontières ascendantes. I. Chymotrypsinogène 8 fois cristallisé et lyophilisé, pH = 4.50, gradient de potentiel: 6.94 volt cm⁻¹, durée: 19,020 sec. II. DIP-chymotrypsine- δ préparée comme il est indiqué dans le texte, pH = 4.85, gradient de potentiel: 7.0 volt cm⁻¹, durée: 15,000 sec. III. DIP-chymotrypsine- α préparée à partir de chymotrypsine- α cristallisée 5 fois et elle-même cristallisée 3 fois puis lyophilisée, pH = 4.40, gradient de potentiel: 6.80 volt cm⁻¹, durée: 16,000 sec. IV. DIP-chymotrypsine- γ préparée à partir de chymotrypsine- γ cristallisée 4 fois et elle-même cristallisée 3 fois puis lyophilisée, pH = 4.55, gradient de potentiel 6.9 volt cm⁻¹, durée: 16,000 sec.

III. IDENTIFICATION DU PEPTIDE X-BASE

L'hypothèse précédente postule qu'un peptide X-base doit être libéré pendant l'activation rapide et l'activation lente du chymotrypsinogène. Le peptide et les mélanges qui le contiennent sont généralement assez simples. Néanmoins, l'enquête doit être menée avec le plus grand soin et d'une façon aussi complète que possible car (a) il s'agit de différencier, d'une part, le ou les peptides spécifiques dont la formation est directement liée au processus d'activation et, d'autre part, les peptides non-spécifiques qui ne manquent pas de se produire par dégradation ultérieure ou générale des molécules protéiques. (b) tous les peptides spécifiques doivent être reconnus et identifiés avant qu'une interprétation quelconque du phénomène puisse être donnée.

La Fig. 2 indique comment varient l'activité et la teneur en azote non-protéique (NNP) des solutions de chymotrypsinogène activées par la trypsine.

On pourrait penser que le brusque changement de pente subi par les courbes du NNP au moment où l'activité est maximum signifie que le processus d'activation libère une quantité relativement importante de peptides spécifiques (contenant environ 7 atomes d'azote dans le cas de l'activation rapide et 8-9 atomes dans le cas de l'activation lente) et que des peptides non-spécifiques se forment ensuite peu à peu. Il n'en est rien. Nous verrons plus loin en effet que le peptide de l'activation rapide apparaît au contraire

avec une vitesse assez faible et un certain retard. Une dégradation non-spécifique relativement importante doit donc se produire tout au début de l'activation.

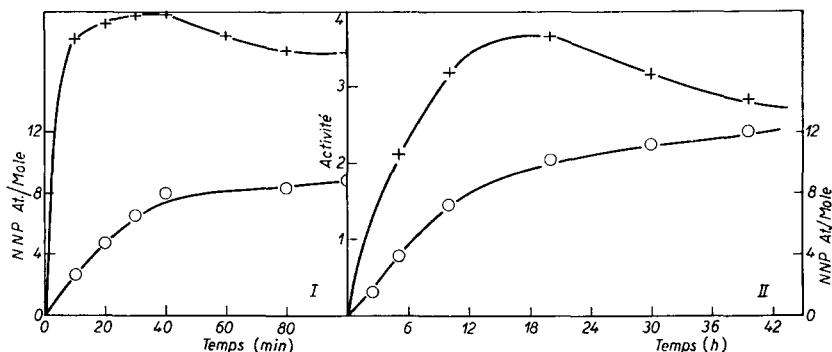


Fig. 2. Activité chymotrypsique et teneur en azote non-protéique. L'activité spécifique (+) est mesurée vis à vis de l'acétyl-L-tyrosine éthylester. L'azote non-protéique (nb. d'atomes d'azote par mole de chymotrypsinogène) (O) est mesuré par Kjeldahl après précipitation dans l'acide trichloracétique à 5% ou l'acide trichloracétique à 10% en présence d'acétone⁵. I. Activation rapide (Tableau I, colonnes 1-4). II. Activation lente (Concentration molaire du chymotrypsinogène: $10.6 \cdot 10^{-4}$; de la trypsin: $0.0023 \cdot 10^{-4}$).

Les peptides ont été étudiés par trois techniques différentes:

1. Chromatographie sur papier

La Fig. 3 reproduit 4 chromatogrammes unidimensionnels dans le système butanol (5) - acide acétique (2) - eau (3). Le premier est fait à partir d'une solution activée rapidement (Tableau I, colonne 2) et les autres, à partir de 3 solutions activées lentement (concentration molaire du zymogène: $44.3 \cdot 10^{-4}$; de la trypsin: $0.004 \cdot 10^{-4}$) pendant 4, 22 et 44h. Les protéines étaient préalablement précipitées dans l'acide trichloracétique à 5% et les liquides surnageants étaient débarrassés de l'acide trichloracétique par traitement avec de la Nalcite S A R forme bicarbonate jusqu'à pH = 4. La résine était lavée par HCl N/1000 et les eaux de lavage réunies à la solution principale.

L'examen de la Fig. 3 montre que la solution obtenue au cours de l'activation rapide du

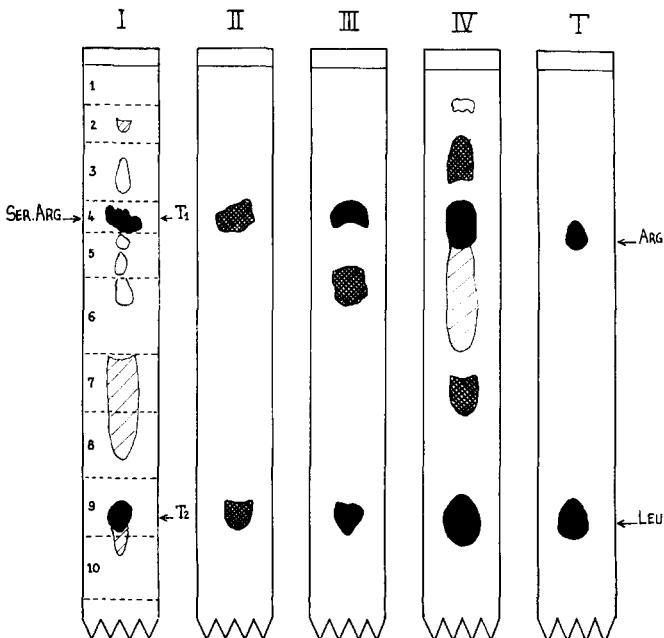


Fig. 3. Chromatographie des peptides sur papier. I: activation rapide. II, III et IV, activation lente. T: témoin. (Pour les conditions de l'activation et de la chromatographie, voir le texte).

chymotrypsinogène fournit deux fortes taches (T_1 et T_2) et une série d'autres taches plus faibles. T_1 qui possède dans le système butanol-acide acétique-eau un R_F légèrement supérieur à celui de l'arginine, ne donne qu'une seule tache dans les systèmes: phénol pH = 4 (R_F un peu plus petit que l'arginine), butanol (30) - acide acétique (6) - pyridine (20) - eau (24) (même R_F que la lysine) et butanol (75) - acide formique (19) - eau (5) (même R_F que l'arginine). Cette tache est Sakaguchi-positive. Par hydrolyse dans HCl 5.6 N à 115° pendant 22h, elle engendre exclusivement de la sérine et de l'arginine. Un dosage quantitatif¹⁷ de ces deux aminoacides donne un rapport molaire Ser/Arg égal à 0.88. Après condensation avec FDNB et hydrolyse, on identifie la DNP-sériste et on ne trouve plus de sérine libre. T_1 est donc formée par la sérylarginine. Un dosage de Sakaguchi montre que l'"équivalent leucine" de ce peptide pendant le dosage à la ninhydrine²² est 0.96.

Dans le système butanol-acide formique-eau, T_2 par contre donne au moins deux taches T_{21} et T_{22} . T_{21} , située au niveau de la sérine, est assez importante. Mais son hydrolyse chlorhydrique après élution ne permet pas de déceler un seul aminoacide en quantité notable, alors qu'une quantité équivalente de sérylarginine (si l'on en juge par la coloration des taches) engendre de très gros spots de sérine et d'arginine*. T_{21} ne contient en outre pas de tryptophane puisqu'elle ne donne aucune coloration avec le réactif d'Ehrlich. La nature des substances qui la constituent nous est donc encore inconnue. T_{22} migre un peu plus vite que la sérine dans le système butanol-acide formique-eau. Son identification complète n'a pas été recherchée car son intensité est beaucoup plus faible que celle de la sérylarginine.

Après 4h d'activation lente (chromatogramme II), on obtient également les deux taches T_1 et T_2 . Les peptides formés au début de cette activation ne sont donc probablement pas très différents de ceux de l'activation rapide. La sérylarginine s'y trouve en abondance. Mais, dès que l'activation a progressé davantage (chromatogrammes III et IV de la Fig. 3), le mélange peptidique devient beaucoup plus compliqué.

2. Chromatographie des DNP-peptides

Malgré l'existence de cette tache T_{21} dont nous n'avons pas encore terminé l'étude, la chromatographie sur papier suggère fortement que la sérylarginine est le seul peptide spécifique de l'activation rapide. Toutefois, cette chromatographie exige que l'on précipite les protéines par l'acide trichloracétique. On peut alors craindre que certains peptides soient entraînés par le précipité protéique ou adsorbés par la Nalcite**. Il convient donc de confirmer les résultats précédents par d'autres techniques.

Les divers extraits obtenus au moment de la préparation des DNP-protéines (voir chapitre I) contiennent en principe les DNP-peptides de l'activation rapide. E_1 est fortement coloré. Il est extrait par l'éther et l'acétate d'éthyle, débarrassé de ses sels par passage à travers une colonne de talc²³ puis chromatographié dans une colonne contenant 1 g d'hyflosupercl tamponné avec 0.5 ml de phosphate 0.25 M à pH = 6.35²⁴. La colonne est élueée avec un mélange de 1% chloroforme-méthyléthylcétone. Il se forme

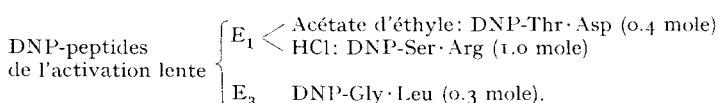
* Nous avons d'ailleurs découpé le chromatogramme I en 10 zones (numérotées de 1 à 10 dans la Fig. 3). Les zones ont été élues, hydrolysées et chromatographiées. Seule la zone 4 donne des spots bien définis d'aminoacides.

** L'élimination des protéines peut être réalisée, comme dans la technique à la carboxypeptidase, par adsorption sélective des aminoacides et des peptides sur une résine convenable. Mais on peut alors craindre que certains peptides ne soient pas adsorbés ou qu'ils soient retenus irréversiblement. Le doute subsiste donc.

une bande principale ($R = 0.4$) dont l'hydrolyse fournit la DNP-sérine et l'arginine. Il s'agit donc une fois encore de la sérylarginine*.

Tous les autres extraits ne sont pas suffisamment colorés pour justifier une étude détaillée, sauf E_3 (méthyléthylcétone). Ce dernier, chromatographié dans une colonne d'hyflosupercl avec le mélange 30% chloroforme-méthyléthylcétone fournit une bande ($R = 0.1$), laquelle n'engendre ni DNP-aminoacide ni aminoacide par hydrolyse-acide**. Comme la précédente, la technique ne permet donc d'identifier que la sérylarginine parmi les peptides de l'activation rapide.

Le mélange des DNP-peptides engendrés par l'activation lente est plus compliqué. Son étude n'est pas encore terminée. Il est cependant intéressant de signaler dès maintenant que ce mélange contient beaucoup de DNP-sérylarginine (1 mole par mole de zymogène) et des quantités assez notables d'acide DNP-thréonylaspartique et de DNP-glycylleucine.



Il se confirme donc que l'activation lente engendre de la sérylarginine comme l'activation rapide.

3. Chromatographie sur Dowex-50

Afin de ne pas risquer de manquer un peptide dont le dérivé DNP serait insoluble dans les solvants $E_1 - E_5$, nous avons enfin eu recours à la chromatographie sur Dowex-50 $\times 8$ ***. Au cours d'une première série d'essais (diagramme I de la Fig. 4), 10 μ -mole de chymotrypsinogène sont activées dans les conditions de la 2° colonne du Tableau I. Après incubation de 15 min avec 50 μ -mole de DFP, les solutions sont déféquées par addition d'un égal volume d'acide trichloracétique à 10% puis débarrassées de l'acide trichloracétique par traitement avec de la Nalcite S A R forme bicarbonate jusqu'à pH = 4. Le liquide surnageant est évaporé à sec et le résidu est repris par le tampon citrate pH = 3.42. La solution est ensuite ajustée à pH = 2.5-3.0 avant d'être mise dans la colonne. Au cours d'une 2° série d'essais, les traitements par l'acide trichloracétique et la Nalcite sont omis.

Les deux diagrammes de la Fig. 4 font apparaître un pic principal situé entre ceux de la lysine et de l'arginine. Le pic qui le précède immédiatement contient sans doute de l'ammoniac puisqu'il sort au moment où le phosphate pH = 6.8 est remplacé par le citrate pH = 6.5[§]. Les autres pics sont nettement moins importants.

La pureté du pic principal et la nature de son constituant ont été contrôlées par deux techniques différentes: dessalage, hydrolyse et chromatographie sur papier ou hydrolyse directe et chromatographie sur Dowex-50. Deux techniques de dessalage ont été utilisées: (a) 1 ml de liquide prélevé dans la branche montante ou dans la branche descendante du pic et contenant 0.15-0.3 μ -mole de peptide est amené à pH = 4.0 par

* La DNP-sérylarginine migre à la même vitesse que la leucine dans le système butanol-acide formique-eau.

** Le dinitrophénol possède aussi un R égal à 0.1 dans ce système.

*** Il eût été plus logique d'employer du Dowex-50 $\times 4$. Mais nous n'en disposions pas au moment où le travail a été entrepris.

§ Après dessalage et hydrolyse, ce pic n'engendre d'ailleurs que des quantités relativement faibles de divers aminoacides.

addition d'acide chlorhydrique et chromatographié dans une colonne (1.1×2.0 cm) de Dowex- 50×12 forme NH^+ . On lave par 10 ml d'acide acétique 0.2 M et on élue avec un mélange acétate d'ammonium-ammoniaque, pH = 11 $\mu = 0.04$. Le peptide sort dans les 4 premiers ml. L'acétate d'ammonium qui l'accompagne est aisément éliminé par sublimation*. (b) Le même volume de liquide à pH = 4 est chromatographié dans une colonne de Dowex- 50×12 forme H^{+25} .

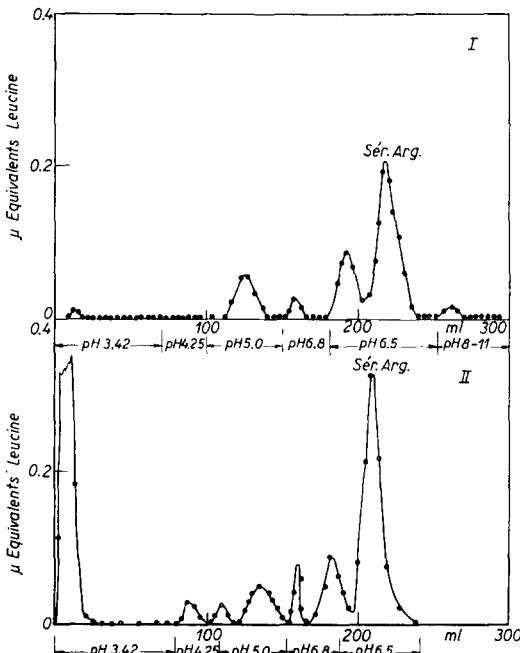


Fig. 4. Chromatographie des peptides de l'activation rapide sur Dowex-50. Dowex- 50×8 forme Na^+ 250-400 mailles. Colonnes 0.9×15 cm. Tampons²⁵ citrate pH = 3.42, 4.25 et 5.0 puis phosphate pH = 6.8, 6.5 et bicarbonate-carbonate pH = 8-11. Temp.: 25°. Débit: 4 ml à l'heure. Fractionnement automatique par ml. Dosage à la ninhydrine en présence de chlorure stannieux²². Diagramme I: Défecation préalable et traitement à la Nalcite S A R forme bicarbonate. Diagramme II: Pas de défecation et par conséquent pas de traitement à la Nalcite. N'étant pas adsorbées par le Dowex- 50×8 , les protéines dans cette expérience sortent immédiatement après le volume mort de la colonne.

En outre, un volume de liquide prélevé au sommet du pic et contenant 4 μ -mole de peptide est évaporé. Le résidu est hydrolysé dans HCl 5.6 N. L'hydrolysat est divisé en 2 parties égales. Par chromatographie de la 1^o dans une colonne de Dowex- 50×8 (0.9×100 cm) pour aminoacides acides et neutres²⁵, on obtient le diagramme de la Fig. 5. Par chromatographie de la 2^o dans une colonne de Dowex- 50×8 (0.9×15 cm) pour aminoacides basiques²⁵, on obtient le diagramme de la Fig. 6. Ces diagrammes montrent que l'hydrolysat contient presque exclusivement de la sérine (1.8 μ -mole) et de l'arginine (2.28 μ -mole). Le pic principal de la Fig. 4 est donc bien formé par la sérylarginine.

La chromatographie sur Dowex-50 n'a pas encore été appliquée aux peptides de l'activation lente.

En somme, les résultats précédents prouvent que l'activation rapide et l'activation lente du chymotrypsinogène forment toutes les deux des quantités considérables de sérylarginine. Ce peptide est-il le seul spécifique de l'activation? Il semble bien que oui, dans le cas tout au moins de l'activation rapide. Si un autre peptide spécifique était formé en grosse quantité au cours de cette activation, il faudrait en effet: (a) qu'il soit adsorbé par le précipité trichloracétique de protéines ou par la Nalcite; (b) qu'il ne se

* Le principe de ce dessalage nous a été suggéré par Dr. S. MOORE dans une communication personnelle.

** Cette deuxième technique n'est utilisable que pour les peptides basiques. Elle peut en outre provoquer un début d'hydrolyse de certains peptides fragiles.

combine pas au FDNB ou que son dérivé DNP soit insoluble dans HCl, l'éther, l'acétate d'éthyle, la méthyléthylcétone, le *n*-butanol et le bicarbonate de Na; (c) qu'il sorte de la colonne de Dowex en même temps que la fraction protéique (diagramme II de la Fig. 4) ou qu'il ne colore pas la ninhydrine. Autrement dit, il faudrait que ce peptide supplémentaire soit cyclique ou très gros. Les deux alternatives sont fort invraisemblables, tout au moins pour l'instant*.

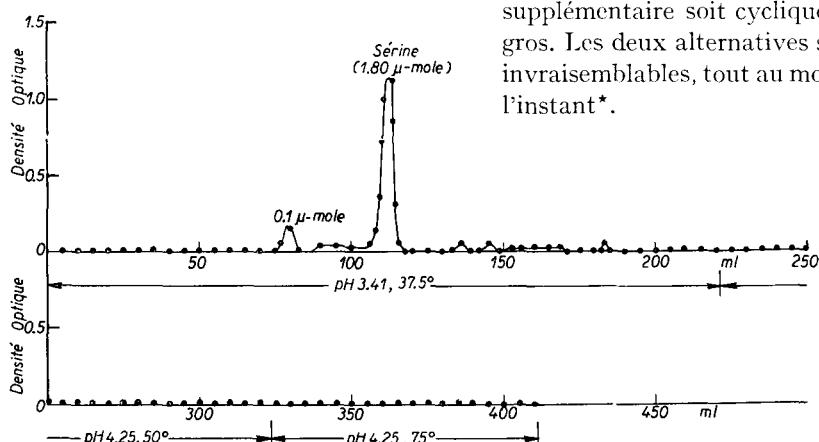


Fig. 5. Chromatographie sur Dowex-50 de l'hydrolysat du pic principal. Colonne 0.9×100 cm pour aminoacides acides et neutres²⁵.

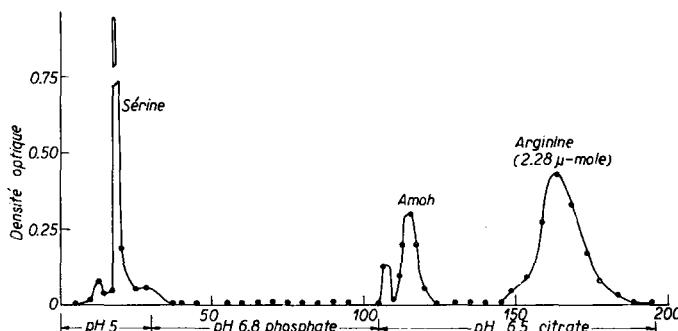


Fig. 6. Chromatographie sur Dowex-50 de l'hydrolysat du pic principal. Colonne 0.9×15 cm pour aminoacides basiques²⁵.

Si, comme nos expériences le font croire, la sérylarginine est vraiment le seul peptide de l'activation rapide, nous pouvons préciser considérablement notre hypothèse précédente en assimilant le résidu "base" à l'arginine et le résidu "X" à la sérotonine. Nous allons donc dire: (a) Pendant l'activation du chymotrypsinogène en enzyme- π une liaison arginyl-*isoleucine* est rompue par la trypsin; (b) pendant la conversion $\pi \rightarrow \delta$, une liaison leucyl-sérotonine est rompue par autolyse et le peptide sérylarginine est libéré.

IV. FORMATION DES CHYMTROPSINES π ET δ PENDANT L'ACTIVATION RAPIDE

D'après ce qui vient d'être dit, on peut penser que la formation de l'enzyme- π et de l'enzyme- δ nécessite l'apparition d'un résidu N-terminal d'*isoleucine*, mais que seule la formation de l'enzyme- δ exige la libération de sérylarginine. Cette conception est

* Notons en particulier que le poids moléculaire des chymotrypsines n'est pas très différent de celui du chymotrypsinogène, ce qui exclut la formation d'un gros peptide spécifique.

d'ailleurs un peu simpliste, car il n'est pas exclu que d'autres chymotrypsines (possédant par exemple de la thréonine N-terminale (Tableau I) et de la tyrosine C-terminale⁹

prennent naissance en faible quantité pendant l'activation rapide*. Néanmoins, si l'enzyme- δ se forme réellement au cours de la dégradation ultérieure de l'enzyme- π , la libération de la sérylarginine doit avoir un certain retard sur l'apparition de l'activité et sur celle de l'isoleucine N-terminale. Ce retard doit en outre être augmenté par la présence de β -phénylpropionate qui, d'après BETTELHEIM ET NEURATH⁹ ralentit la conversion $\pi \rightarrow \delta$. La sérylarginine et l'isoleucine N-terminale ont donc été dosées systématiquement en fonction du temps par la technique au FDNB. Certains résultats concernant la sérylarginine ont pu en outre être confirmés grâce à la chromatographie sur Dowex-50. Les courbes obtenues sont reproduites dans les Fig. 7 et 8.

L'examen des courbes des Fig. 7 et 8 montre que:

1. Le retard prévu existe bien. Il illustre de façon très suggestive toutes nos conceptions antérieures. La courbe d'isoleucine suit fidèlement la courbe d'activation. La courbe de sérylarginine monte par contre plus lentement, surtout en présence de β -phénylpropionate. C'est qu'elle correspond à la formation ultérieure d'un nouvel enzyme par auto-lyse progressive du premier. L'ablation de ce peptide basique détermine d'ailleurs bien la variation de mobilité électrophorétique constatée par BETTELHEIM ET NEURATH⁹. Les points marqués du signe \diamond sont en effet relatifs à l'apparition du pic "lent" déterminé par ces auteurs.

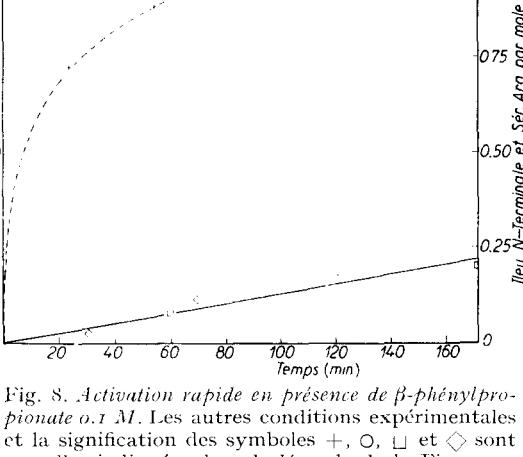


Fig. 7. Activation rapide dans les conditions ordinaires. Pour les conditions d'activation, voir le Tableau I, colonnes 1-4. + Activité (en % de l'activité maximum); O DNP-isoleucine (mole par mole de zymogène); □ DNP-Ser-Arg (mole par mole de zymogène); ◇ Valeurs obtenues au cours de l'étude des diagrammes électrophorétiques⁹ (voir le texte).

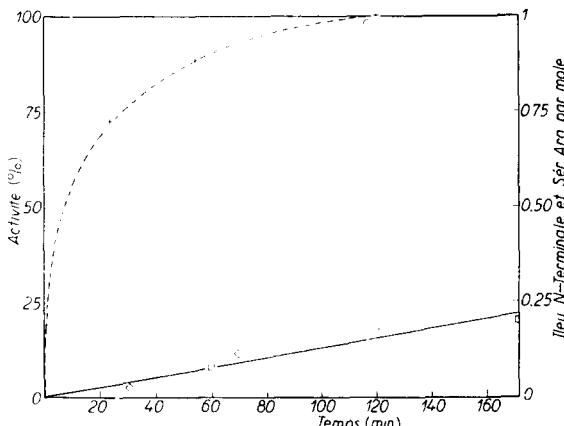


Fig. 8. Activation rapide en présence de β -phénylpropionate 0.1 M. Les autres conditions expérimentales et la signification des symboles +, O, □ et ◇ sont celles indiquées dans la légende de la Fig. 7.

auteurs. Ils se situent très près des courbes d'activation (90 min).

2. L'existence d'un plateau dans la courbe d'activité (Fig. 7) entre la 12^o et la 50^o

* Pour être plus précis, il faudrait dire que nous désignons, tout au moins dans ce chapitre, sous le nom d'enzyme- δ toutes les chymotrypsines de l'activation rapide susceptibles de prendre naissance à partir de l'enzyme- π grâce à l'ablation du peptide sérylarginine. D'ailleurs, l'enzyme- δ est certainement le représentant le plus important de ce groupe et le seul défini jusqu'à présent.

minutes, alors que tout le chymotrypsinogène est déjà activé (existence de 1 résidu d'isoleucine par mole) et qu'une forte quantité de l'enzyme- π est en train de se convertir en enzyme- δ (35-40%), confirme enfin l'observation déjà faite par BETTELHEIM ET NEURATH⁹, selon laquelle l'activité estérasique des enzymes π et δ , est analogue*. Cette activité, qui apparaît au moment de la rupture de la 1° liaison, n'est donc pas affectée de façon sensible par la rupture d'une 2° liaison voisine et le départ du dipeptide. Mais elle est au contraire nettement diminuée par la ou les ruptures supplémentaires intervenant pendant la formation de l'enzyme- α .

RÉSUMÉ

Le présent mémoire donne le compte-rendu détaillé d'une série d'expériences dont les résultats essentiels ont déjà fait l'objet de trois notes préliminaires.

Les travaux de JACOBSEN laissaient prévoir que l'activation "rapide" du chymotrypsinogène par des quantités de trypsin relativement fortes donne naissance à deux chymotrypsines (π et δ) différentes de la chymotrypsine- α et plus actives qu'elle. En fait, la conversion chymotrypsinogène → enzyme- π et par conséquent l'activation proprement dite se produisent alors qu'une liaison arginyl-isoleucine est rompue par la trypsin au sein du zymogène. La conversion enzyme- π → enzyme- δ semble être assurée par la rupture autolytique d'une liaison leucyl-sérine dans l'enzyme- π , provoquant l'ablation du peptide sérylarginine. Cette deuxième rupture n'influe pas de façon sensible sur l'activité estérasique.

Le dérivé diisopropylphosphorylé de l'enzyme- δ peut être obtenu à l'état cristallisé. Bien que les tests chimiques permettent de la considérer comme pure, cette préparation n'est pas homogène à l'électrophorèse. Les dérivés des chymotrypsines α et γ ainsi que celui de la trypsin ne le sont d'ailleurs pas non plus.

La formation de la chymotrypsine- α demande également la rupture de la liaison arginyl-isoleucine et l'ablation du peptide sérylarginine. Mais, en outre, elle exige au moins une autre protéolysé indépendante, laquelle entraîne une diminution dans la capacité d'activation du zymogène.

SUMMARY

The present article gives a detailed account of a series of experiments, the essential results of which have already been given in three previous communications.

From the work of JACOBSEN it could be anticipated that the "rapid" activation of chymotrypsinogen by relatively large quantities of trypsin would give rise to two chymotrypsins (π and δ) different from and more active than α -chymotrypsin. In fact, the conversion of chymotrypsinogen → π -enzyme, and consequently the activation itself, takes place as a result of the rupture of the arginyl-isoleucine bond by the trypsin in the zymogen. The conversion of π -enzyme → δ -enzyme seems to be brought about by the autolytic rupture of a leucyl-serine bond in the π -enzyme, thus causing the removal of serylarginine peptide. This second rupture has no perceptible influence on the esterase activity.

The diisopropylphosphate derivative of δ -enzyme can be obtained in the crystalline state. Although this preparation can be considered as chemically pure it is not homogeneous electroforetically; this applies also to the α - and γ -chymotrypsin derivatives as well as to the trypsin derivatives.

The formation of the α -chymotrypsin calls likewise for the rupture of the arginyl-isoleucine bond and the removal of seryl-arginine peptide. However, another independent proteolysis is required and this involves a diminution in the activation capacity of the zymogen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die gegenwärtige Arbeit bringt einen ausführlichen Bericht über eine Reihe von Versuchen, deren wesentliche Ergebnisse bereits in 3 vorhergehenden Mitteilungen veröffentlicht wurden.

Die Arbeit von JACOBSEN liess voraussehen, dass die "schnelle" Aktivierung von Chymo-

* D'après JACOBSEN⁵, le pouvoir coagulant de l'enzyme- δ vis à vis du lait serait inférieur à celui de l'enzyme- π . Il serait donc intéressant de comparer la véritable activité protéolytique des deux enzymes.

trypsinogen durch verhältnismässig grosse Mengen von Trypsin die Bildung von zwei, sich von Chymotrypsin α unterscheidenden, Chymotrypsinen (π und δ) verursacht, welche aktiver sind als Chymotrypsin α . Tatsächlich findet die Umwandlung Chymotrypsinogen $\rightarrow \pi$ -Enzym, und demzufolge die eigentliche Aktivierung statt, indem Trypsin im Inneren des Zymogens eine Arginyl-Isoleucin-Bindung sprengt. Die Umwandlung π -Enzym $\rightarrow \delta$ -Enzym, scheint durch die autolytische Sprengung einer Leucyl-Serin-Bindung im π -Enzym hervorgerufen zu werden, wodurch der Abfall des Seryl-Arginin-Peptides verursacht wird. Diese zweite Sprengung übt keinen wahrnehmlichen Einfluss auf die Esteraseaktivität aus.

Das Diisopropylphosphatderivat des δ -Enzyms kann in kristallinem Zustand erhalten werden. Obgleich dieses Präparat als chemisch rein betrachtet werden kann, erweist es sich als elektrophoretisch nicht homogen.

Die Derivate von Chymotrypsin α und γ , sowie die Trypsinderivate sind es übrigens auch nicht.

Die Bildung von Chymotrypsin setzt gleichfalls die Sprengung der Arginyl-Isoleucin-Bindung und den Abfall des Seryl-Argininpeptides voraus. Sie benötigt jedoch außerdem wenigstens eine andere, unabhängige Proteolyse, welche eine Senkung seiner Wirksamkeit auf die Zymogenaktivierung verursacht.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, Columbia Univ. Press, New York, 1948.
- ² P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1496.
- ³ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.
- ⁴ J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 345.
- ⁵ C. F. JACOBSEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim.*, 25 (1947) 325.
- ⁶ M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 300.
- ⁷ M. ROVERY, M. POILROUX ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 145.
- ⁸ M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 590.
- ⁹ F. R. BETTELHEIM ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 241.
- ¹⁰ W. J. DREYER ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 814.
- ¹¹ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 481.
- ¹² M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 702.
- ¹³ P. DESNUELLE ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 181.
- ¹⁴ R. M. HERRIOTT, IN McELROY ET GLASS, *The Mechanism of Enzyme Action*, Baltimore, 1954, p. 24.
- ¹⁵ E. F. JANSEN, M. D. F. NUTTING, R. JANG ET A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 189.
- ¹⁶ I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- ¹⁷ R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1975.
- ¹⁸ A. R. THOMPSON, *Nature*, 169 (1952) 495.
- ¹⁹ F. R. BETTELHEIM, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 235.
- ²⁰ R. EGAN, H. O. MICHEL ET R. SCHLUETER, *Federation Proc.*, 13 (1954) 202.
- ²¹ L. W. CUNNINGHAM, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 13.
- ²² S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- ²³ F. SANGER, *Biochem. J.*, 45 (1949) 563.
- ²⁴ R. MONIER ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 62.
- ²⁵ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
- ²⁶ W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 45.

Reçu le 6 avril 1955