

REFERENCES

- ¹ R. M. HERRIOTT in W. D. McELROY AND B. GLASS, *The Mechanisms of Enzyme Action*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 24.
- ² H. VAN VUNAKIS AND R. M. HERRIOTT, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 537.
- ³ S. MOORE AND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 893.
- ⁴ S. MOORE AND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- ⁵ E. BRAND, in J. H. NORTHROP, M. KUNITZ AND R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, 2nd Ed., Columbia University Press, New York, 1948.
- ⁶ R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 21 (1938) 501.
- ⁷ R. M. HERRIOTT, V. DESREUX AND J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1940) 213, Table VII.
- ⁸ R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 65.
- ⁹ R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1941) 325.
- ¹⁰ F. SANGER, *Advances in Protein Chem.*, 8 (1952) 1.
- ¹¹ R. R. PORTER, *Methods in Medical Research*, 3 (1950) 256.
- ¹² H. VAN VUNAKIS, *Doctorate dissertation*, Columbia Univ., New York, 1951; *Univ. Microfilms* (Ann Arbor, Mich.), Publ. No. 2865.
- ¹³ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ¹⁴ G. L. MILLS, *Nature*, 165 (1950) 403.
- ¹⁵ A. G. LOWTHER, *Nature*, 167 (1951) 767.
- ¹⁶ J. K. MIETTINEN AND A. J. VIRTANEN, *Acta Chem. Scand.*, 3 (1949) 459.
- ¹⁷ V. M. INGRAM, *Nature*, 167 (1951) 83.
- ¹⁸ H. B. BULL, *Ann. Rev. Biochem.*, 21 (1952) 196.
- ¹⁹ M. B. WILLIAMSON AND J. M. PASSMAN, *43rd Ann. Meeting Am. Soc. Biol. Chemists*, New York, April, 1952.
- ²⁰ M. B. WILLIAMSON AND J. M. PASSMAN, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 121.
- ²¹ J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930) 767.
- ²² H. L. KERN, *Doctorate dissertation*, Johns Hopkins University, Baltimore, 1953.
- ²³ J. ST. L. PHILPOT AND I. B. ERIKSON-QUENSEL, *Nature*, 132 (1933) 932.
- ²⁴ J. STEINHARDT, *J. Biol. Chem.*, 123 (1938) 543.
- ²⁵ H. NEURATH, G. R. COOPER AND J. O. ERICKSON, *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 411.
- ²⁶ J. H. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930) 739.
- ²⁷ H. A. DIEU AND H. B. BULL, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 450.
- ²⁸ H. B. BULL, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 27.
- ²⁹ M. F. MALLETT, unpublished.
- ³⁰ F. SANGER AND E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 225.
- ³¹ J. B. PASSMAN AND M. B. WILLIAMSON, *Abstr. Am. Chem. Soc. Meeting*, 1954, p. 91C.
- ³² R. M. HERRIOTT, in J. H. NORTHROP, M. KUNITZ AND R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, 2nd Ed., Columbia University Press, New York, 1948.
- ³³ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 25 (1942) 355.
- ³⁴ E. L. SMITH AND A. STOCKELL, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 501.
- ³⁵ C. H. W. HIRS, W. STEIN AND S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 941.

Received August 6th, 1956

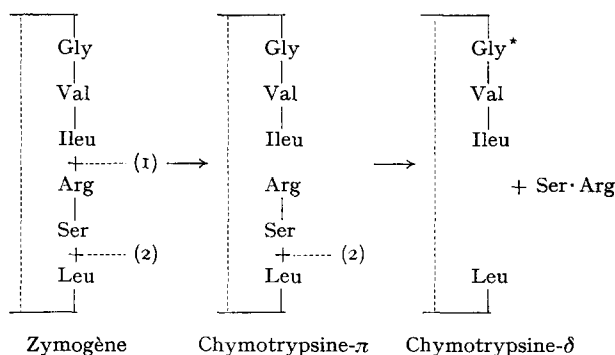
SUR LA DÉGRADATION DU CHYMOTRYPSINOGENE PAR LA CHYMOTRYPSINE

M. ROVERY, M. POILROUX, A. YOSHIDA* ET P. DESNUELLE
Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

L'attaque du chymotrypsinogène par la trypsine a été récemment étudiée de façon précise¹⁻⁵. On sait qu'elle est rapide, même à basse température, et qu'elle a pour effet principal de rompre une liaison peptidique reliant un résidu d'arginine à un résidu d'isoleucine (liaison (1)). On sait également que cette rupture provoque l'activation du zymogène c'est à dire sa transformation en chymotrypsine- π , premier représentant de la famille des chymotrypsines. L'enzyme- π s'autolyse ensuite au

* Professeur associé de l'Université de Tokyo.

niveau d'une liaison leucyl-sérine (liaison (2)). Cette deuxième rupture provoque la libération d'un dipeptide, la sérylarginine et la conversion de l'enzyme- π en un autre enzyme doué d'une activité analogue (chymotrypsine- δ). L'ensemble des deux phénomènes, connu sous le nom d'activation "rapide" du chymotrypsinogène, peut être schématisé comme suit:



La question se pose maintenant de savoir comment agissent les autres enzymes protéolytiques sur le chymotrypsinogène. Quelles dégradations lui font-ils subir? Ces dégradations sont-elles capables de l'activer, comme celle réalisée par la trypsine? Dans le cas contraire, laissent-elles au moins subsister l'aptitude de la molécule à être ultérieurement activée? Nous avons abordé ces problèmes par l'étude des dégradations chymotrypsiques du chymotrypsinogène, étant donné le rôle important qu'elles jouent dans la genèse des chymotrypsines du type α . Deux notes préliminaires^{7,8} leur ont été déjà consacrées.

I. RÉSIDUS APPARAISSANT EN POSITION N-TERMINALE PENDANT L'ATTAQUE CHYMOTRYPSIQUE DU CHYMOTRYPSINOGENE

Nous avons montré dans une récente note⁷ que le chymotrypsinogène est attaqué par la chymotrypsine- δ . Cette attaque est beaucoup plus lente que l'attaque trypsique. Elle est néanmoins sensible car elle fait apparaître dans la fraction protéique des résidus de thréonine, d'alanine et de sérine en position N-terminale. Le Tableau I indique les résultats d'expériences nouvelles et plus précises réalisées avec la chymotrypsine- α . On voit que les résidus de thréonine et d'alanine ne se forment pas indépendamment l'un de l'autre. La thréonine est tout d'abord engendrée grâce à la rupture d'une première liaison peptidique. Puis, elle est remplacée par l'alanine, ce qui implique la rupture d'une seconde liaison et probablement aussi la libération d'un peptide. La rupture de cette seconde liaison est considérablement accélérée par le sulfate d'ammonium. Divers auteurs ont déjà signalé que certains sels (SO_4Mg , KCl , NaCl) augmentent les activités estérasique⁹ et amidasique¹⁰ de la chymotrypsine. Mais le phénomène présente ici un intérêt particulier car la liaison dont la rupture est accélérée est une véritable liaison peptidique et la nature de cette liaison va

* Ce résidu de glycolle en 3° position a été récemment trouvé par hydrolyse partielle du dérivé dinitrophénylé de la chymotrypsine- δ . Il est curieux de constater que trois résidus identiques occupent la même position dans les molécules de chymotrypsines et dans la molécule de trypsine⁶. Cette identité entre les deux types d'enzymes se poursuit peut-être au delà du 3° résidu.

bientôt nous être connue* (liaison asparaginyl-alanine (voir plus loin)). En d'autres termes, nous pouvons localiser l'effet accélérateur du sel et dire qu'il intervient au niveau d'une liaison peptidique déterminée. Le calcium, qui augmente de façon très notable l'activité estérasiqye de la chymotrypsine- $\alpha^{12,13}$, n'a dans le cas présent aucune action.

Quant à la sérine N-terminale, nous la voyons se former avec lenteur dès le début par un processus apparamment indépendant. Pour que ses proportions deviennent notables, nous devons mettre du sulfate d'ammonium et élever la température au risque de déclancher une dégradation générale des molécules (dernière ligne du Tableau I, 6° et 7° colonnes). Nous allons donc la trouver associée à l'alanine dans une fraction protéique relativement peu abondante.

Rappelons que les protéolyses additionnelles² de l'activation "lente" du chymotrypsinogène engendrent aussi de l'alanine (chymotrypsine- α) et de la thréonine N-terminales (chymotrypsine- α_1 ⁷). La présence de la sérine N-terminale est à rapprocher de la rupture de la liaison leucyl-sérine (liaison (2)) pendant l'autolyse de la chymotrypsine- π^2 . Tous ces faits seront interprétés de façon complète un peu plus loin. Contentons-nous pour le moment de constater que le chymotrypsinogène donne naissance par dégradation chymotrypsique à de nouvelles protéines et que les meilleures conditions pour préparer ces protéines sont les suivantes: protéine à thréonine N-terminale (colonne 3 du Tableau I): 1 h de protéolyse à 25° sans SO_4Am_2 ; protéine à alanine N-terminale (colonne 2): 48 h à 4° avec SO_4Am_2 0.3 M; protéine à alanine et sérine N-terminales (colonne 5): 24 h à 25° avec SO_4Am_2 0.3 M.

TABLEAU I

RÉSIDUS N-TERMINAUX (FRACTION PROTÉIQUE) APPARAISSANT PENDANT L'ATTAQUE CHYMOTRYPSIQUE DU CHYMOTRYPSINOÈNE

Chymotrypsinogène: $4.45 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Chymotrypsine- α : $0.45 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Rapport enzyme/substrat: $1.0 \cdot 10^{-1}$. Chaque protéine est cristallisée 5 fois avant usage, dialysée et lyophilisée. Le pH est 7.6 pendant l'hydrolyse. Une quantité de trypsine-inhibiteur du soja égale à 1/50 de la quantité de chymotrypsine est ajoutée à tous les essais afin d'annuler la faible activité trypsique que l'on rencontre dans les préparations de chymotrypsine- α , même après plusieurs cristallisations. Les résidus N-terminaux sont déterminés par la technique de SANGER. Les chiffres (mole de résidus par mole de zymogène pesant 22,500 g) sont relatifs aux résidus N-terminaux *apparus* dans les *protéines* pendant l'hydrolyse chymotrypsique.

	1	2	3	4	5	6	7
Durée de la protéolyse (h)	48	48	1	5	24	47	5½
Temp. (°C)	4	4	25	25	25	25	37
SO_4Am_2 0.3 M	—	+	—	+	+	+	+
Résidus N-terminaux							
Thréonine	0.5	0.1	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3
Alanine	0.1	0.5	0.0	0.5	0.6	0.5	0.3
Sérine	0.1	0.2	0.1	0.3	0.4	0.4	0.3
Autres résidus	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
Protéines à la fin de la protéolyse (%)	—	—	75	—	—	48	40

* On sait depuis longtemps que quelques ions minéraux sont capables d'influencer l'hydrolyse enzymatique de certaines protéines. Mais le fait de pouvoir déterminer la ou les liaisons sur lesquelles s'exerce cette influence, nous paraît important. Il sera discuté de façon plus précise dans une prochaine publication relative à l'effet du calcium pendant l'activation autocatalytique du trypsinogène¹¹.

II. LES "NÉOCHYMOTRYPSINOGENES" ENGENDRÉS PAR LA CHYMOTRYPSINE

Les trois protéines dont nous venons de parler sont dépourvues d'activité chymotrypsique (activité estérasique sur l'acétyl-L-tyrosine éthylester). Mais elles sont activables par la trypsine. Elles méritent donc ce nom de "néochymotrypsinogène" que nous avons récemment proposé⁸ pour toutes les formes dégradées et encore activables du chymotrypsinogène. Il est intéressant d'identifier de façon précise ces néochymotrypsinogènes particuliers*, de connaître leur structure et d'étudier leur activation.

A. Le néochymotrypsinogène à thréonine N-terminale (Néo-Thr) et celui à alanine N-terminale (Néo-Ala)

1. *Cristallisation et structure.* Nous avons essayé de cristalliser ces deux néochymotrypsinogènes à partir d'hydrolysats préparés dans les conditions du Tableau I (colonnes 3 et 2, respectivement). Les hydrolysats sont d'abord traités par le diisopropylfluorophosphate (10 mole par mole de chymotrypsine) afin d'arrêter la protéolyse au moment voulu. Puis, ils sont amenés à pH = 4.0 par addition de SO_4H_2 N. Les protéines sont précipitées dans SO_4Am_2 0.7 S et le cake est cristallisé en utilisant les conditions préconisées par NORTHROP ET KUNITZ¹⁵ pour la cristallisation du chymotrypsinogène ordinaire. On obtient ainsi des bâtonnets bien formés, courts et épais, avec un rendement de 40–30% après 3 ou 4 cristallisations. On dialyse la solution de ces cristaux contre HCl N/1000 et on lyophilise. On étudie enfin les préparations à l'aide de la technique de SANGER (résidus et séquence N-terminaux) et de la technique à la carboxypeptidase** (résidus et séquences C-terminaux). Les résultats de cette étude sont mentionnés dans le Tableau II.

TABLEAU II
EXTRÉMITÉS N ET C-TERMINALES DES NÉOCHYMOTRYPSINOGENES Néo-Thr ET Néo-Ala

Néochymotrypsinogènes	Extrémité N-terminale		Extrémité C-terminale	
	Résidu principal	Séquence correspondante	Résidu	Séquence
Néo-Thr	Thr	Thr·Asp(NH ₂)·Ala–	Tyr	—
Néo-Ala	Ala	Ala·Asp (ou Asp(NH ₂))–	Tyr	–Lys·Leu·Tyr

Avant d'entreprendre un examen détaillé des résultats du Tableau II, il y a lieu de noter que la cristallisation ne représente pas dans le cas présent un moyen bien efficace de purification. La ou les protéines contenant la sérine N-terminale sont facilement éliminées. Mais les deux protéines que nous désirons obtenir (Néo-Thr et Néo-Ala) cristallisent ensemble. Nous obtenons dans les deux cas des mélanges où la protéine désirée représente simplement le constituant principal. Ces mélanges sont néanmoins assez bien définis pour que les résultats soient facilement interprétables.

Examinons tout d'abord les résultats concernant la séquence C-terminale des

* En dégradant le chymotrypsinogène par d'autres enzymes protéolytiques, on doit obtenir d'autres néochymotrypsinogènes. Une récente étude le montre dans le cas de la subtilisine¹⁴.

** Les détails expérimentaux de la technique employée se trouvent dans une de nos publications antérieures².

néochymotrypsinogènes. Les courbes de la Fig. 1 nous apprennent que la carboxypeptidase libère en premier lieu de la tyrosine (0.7 mole) et une très faible quantité de leucine (0.06 mole). Puis, la réaction enzymatique ralentit beaucoup. Pour la faire repartir, il faut dialyser le mélange et ajouter à nouveau de l'enzyme. Nous retrouvons donc ici cet effet inhibiteur de la tyrosine sur la carboxypeptidase, effet déjà signalé par GLADNER ET NEURATH¹⁶ et dû vraisemblablement à l'existence dans la tyrosine d'un noyau aromatique et d'un carboxyle libre séparés par deux atomes de carbone¹⁷. Quoi qu'il en soit, on assiste pendant le deuxième traitement à la libération de 0.25 mole de tyrosine (0.95 mole au total) et de quantités très substantielles de leucine et de lysine. Les courbes de la Fig. 1 suggèrent que la leucine est libérée avant la lysine et que la séquence C-terminale de Néo-Ala est par conséquent $\text{--Lys}\cdot\text{Leu}\cdot\text{Tyr}^*$. Si cette séquence est exacte, il faut admettre que la libération de la leucine, ordinairement très rapide, est freinée par le résidu de lysine situé à la gauche de la liaison (résidu portant le groupe carbonyle). L'influence du résidu de gauche sur l'hydrolyse d'une liaison peptidique par la carboxypeptidase est encore très mal connue. On sait néanmoins qu'elle existe dans certains cas¹⁷.

Examinons maintenant les résultats concernant les extrémités N-terminales des néochymotrypsinogènes. Comme nous l'avons déjà remarqué, les préparations de Néo-Thr renferment toujours un peu d'alanine N-terminale (0.1 résidu pour 0.6 de thréonine) et les préparations de Néo-Ala, un peu de thréonine (0.1 résidu pour 0.6 d'alanine). En d'autres termes, Néo-Thr contient un peu de Néo-Ala et inversement. Mais ce fait ne nous empêche pas de déterminer sans ambiguïté les séquences N-terminales des deux protéines par la technique classique de SANGER¹⁸. Le dérivé dinitrophénylé (DNP) de Néo-Thr est hydrolysé pendant 20 h par $\text{HCl } 12 N$ à 37° . On trouve dans l'acétate d'éthyle un DNP-peptide qui migre lentement ($R = 0.16$) dans une colonne d'hyflo-supercel tamponné à $\text{pH} = 6.35$ ¹⁹ et éluée par la méthyléthylcétone saturée d'eau. L'hydrolyse totale de ce peptide engendre de la DNP-thréonine, de l'acide aspartique et de l'alanine. Nous allons voir tout à l'heure (paragraphe III) qu'il s'agit de $\text{DNP-Thr}\cdot\text{Asp}(\text{NH}_2)\cdot\text{Ala}$ et que le résidu d'alanine représente en fait le résidu N-terminal de Néo-Ala.

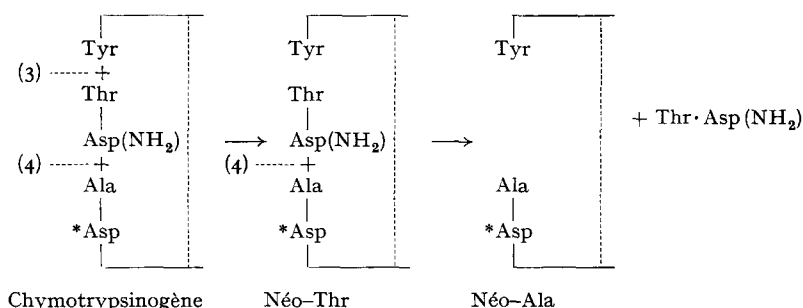
Des opérations analogues effectuées avec le dérivé DNP de Néo-Ala permettent d'isoler une bande ($R = 0.1$ dans la méthyléthylcétone saturée d'eau) qui donne par hydrolyse totale de la DNP-alanine et de l'acide aspartique. La séquence N-terminale de Néo-Ala est donc $\text{Ala}\cdot\text{Asp-}$ ou $\text{Ala}\cdot\text{Asp}(\text{NH}_2)\text{--}^{**}$.

Tout ce qui vient d'être dit suggère que Néo-Thr est formé par la rupture chymotrypsique d'une liaison tyrosyl-thréonine au sein du chymotrypsinogène (liaison (3)) et que Néo-Ala se forme ultérieurement aux dépens de Néo-Thr grâce à la rupture également chymotrypsique d'une liaison asparaginy-alanine (liaison (4)). La première rupture n'est pas surprenante puisqu'elle s'effectue au niveau du carbo-

* D'après GLADNER ET NEURATH¹⁶, la séquence C-terminale de la chymotrypsine- α serait $\text{--Leu}\cdot\text{Ser}\cdot\text{Gly}$ (Leu ou Tyr). Cette formulation est certainement incorrecte car la chymotrypsine- α possède plus d'une séquence C-terminale. Nous voyons ici que le résidu interne de leucine appartient à la chaîne tyrosine. Les séquences C-terminales de l'enzyme- α sont donc vraisemblablement: $\text{--Lys}\cdot\text{Leu}\cdot\text{Tyr}$ et $\text{--Ser}\cdot\text{Gly}\cdot\text{Leu}$.

** Une 2^e bande assez importante ($R = 0.1$ dans le système 5 % chloroforme-méthyléthylcétone-eau) donne par hydrolyse totale les mêmes aminoacides que la 1^e, à savoir la DNP-alanine et l'acide aspartique. On peut évidemment penser que l'une des bandes est $\text{DNP-Ala}\cdot\text{Asp}$ et que l'autre est $\text{DNP-Ala}\cdot\text{Asp}(\text{NH}_2)$. Dans ce cas, la véritable séquence serait $\text{Ala}\cdot\text{Asp}(\text{NH}_2)\text{--}$. Mais il n'est pas encore possible d'être affirmatif à ce sujet.

nyle d'un résidu aromatique. La deuxième l'est davantage car aucune rupture chymotrypsique d'une liaison asparaginyne n'a encore été constatée*. Il y a lieu néanmoins de rappeler que cette dernière exige la présence de sulfate d'ammonium (voir plus haut). On peut parfaitement concevoir que la présence d'un ion particulier incite la chymotrypsine à rompre une liaison d'un type nouveau. Une telle conception mérite d'ailleurs un examen approfondi auquel nous comptons bientôt procéder. Les deux protéolyses donnant successivement naissance à Néo-Thr et Néo-Ala peuvent être schématisées comme suit :



Dans ce schéma, le trait vertical en pointillé symbolise un pont interchaîne assurant la cohésion de la molécule après la rupture des liaisons (3) et (4). L'astérisque au niveau du résidu Asp rappelle que ce résidu peut être de l'acide aspartique ou de l'asparagine. Enfin, mention est faite du peptide $\text{Thr} \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)$. Nous allons dans un instant caractériser complètement ce peptide et montrer qu'il est bien le seul à se former pendant la conversion $\text{Néo-Thr} \rightarrow \text{Néo-Ala}$.

2. *Activation.* Traités par la trypsine, les néochymotrypsinogènes Néo-Thr et Néo-Ala acquièrent une certaine activité chymotrypsique décelable par l'intermédiaire de l'acétyl-L-tyrosine éthylester (Fig. 2). On peut se demander quel est le mécanisme de cette activation et à quel genre de chymotrypsines elle donne naissance.

Nous avons rappelé dans l'introduction que les deux phénomènes caractéristiques accompagnant l'activation "rapide" du chymotrypsinogène sont l'apparition d'isoleucine N-terminale matérialisant la rupture de la liaison (1) et la libération de séril-arginine matérialisant la rupture de la liaison (2). La Fig. 3 indique que ces deux phénomènes se produisent également pendant l'activation des néochymotrypsinogènes. Dans un cas comme dans l'autre, les deux ruptures interviennent successivement. La première détermine l'activation. La seconde provoque la conversion d'un enzyme primaire en un autre enzyme doué d'une activité analogue. Mais, si le mécanisme de l'activation est le même, les enzymes formés dans le cas présent sont certainement différents car ils contiennent les résidus terminaux des néochymotrypsinogènes qui leur ont donné naissance. L'activation "rapide" de Néo-Thr et Néo-Ala engendre en fait les chymotrypsines que l'on obtient d'ordinaire pendant l'activation "lente" du chymotrypsinogène, c'est à dire les chymotrypsines du type α . On remarquera d'ailleurs (Fig. 2) que l'on n'atteint jamais avec les néochymotrypsinogènes une activité spécifique aussi élevée qu'avec le chymotrypsinogène

* Dans le lysozyme²⁰, la chymotrypsine coupe néanmoins une liaison aspartyle et une liaison située sur le flanc aminé d'un résidu asparagine.

proprement dit. Cette activité ne dépasse guère en effet celle de la chymotrypsine- α cristallisée, soit 2.4 environ^{2*}.

En examinant les courbes de la Fig. 3 on s'aperçoit que la sérylarginine n'est pas libérée aussi vite pendant l'activation de Néo-Ala que pendant l'activation du chymotrypsinogène. Ce fait n'est pas étonnant car la chymotrypsine de type α qui

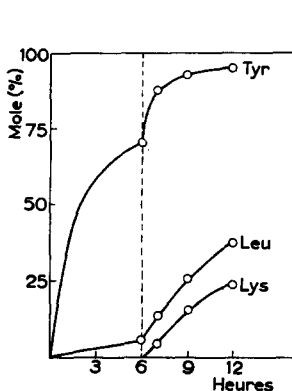


Fig. 1

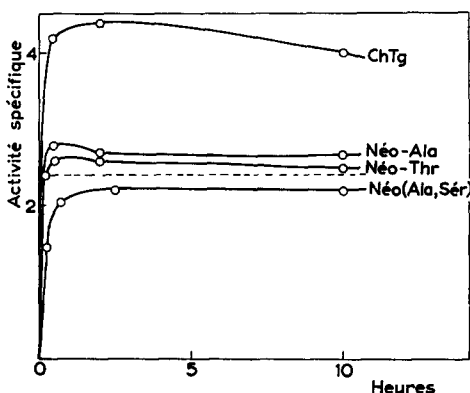


Fig. 2

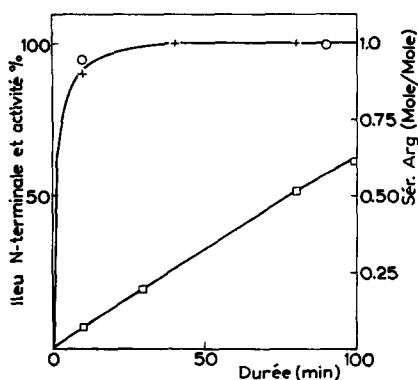


Fig. 3

Fig. 1. Action de la carboxypeptidase sur Néo-Ala. Néo-Ala: $1.0 \cdot 10^{-3}$ mole/ml; carboxypeptidase (en solution dans LiCl et incubée avec le diisopropylfluorophosphate): $2.2 \cdot 10^{-5}$ mole/ml. pH = 7.7. Temp.: 25°. Premier traitement de 6 h. Puis, dialyse du mélange contre HCl $M/1000$ pendant 24 h et addition d'une quantité de carboxypeptidase égale à la première. Un troisième traitement identique provoquerait la libération de faibles quantités d'isoleucine, de valine et de phénylalanine.

Fig. 2. Activation des néochymotrypsinogènes. Les préparations dialysées et lyophilisées sont traitées par la trypsine dans les conditions de l'activation "rapide" du chymotrypsinogène² (temp.: 0°, pH = 7.6, rapport molaire enzyme/substrat: 0.026). L'activité chymotrypsique est mesurée à l'aide de l'acétyl-L-tyrosine éthylester. Elle est exprimée en activité spécifique, c'est à dire rapportée à 1 mg de N-protéique dans

l'hydrolysate. ChTg: chymotrypsinogène ordinaire; Néo-Thr, Néo-Ala et Néo(Ala, Sér) représentent trois néochymotrypsinogènes engendrés par l'attaque chymotrypsique du chymotrypsinogène (voir le texte). L'horizontale en pointillé matérialise l'activité spécifique de la chymotrypsine- α cristallisée (2.4 environ dans les conditions de nos essais).

Fig. 3. Formation d'isoleucine N-terminale et de sérylarginine pendant l'activation tryptique de Néo-Ala. Les conditions de l'activation sont les mêmes que pendant les expériences de la Fig. 2. +: Activité spécifique (en % de l'activité maximum, soit 2.7 dans le cas présent). O: Isoleucine N-terminale (en % de la quantité maximum, soit 1 mole par mole). □: Sérylarginine libre (mole/mole).

* La première préparation de Néo-Ala obtenue dans ce Laboratoire permettait d'obtenir pour une raison mal déterminée une activité spécifique supérieure à 2.4⁸. Ce résultat était d'ailleurs difficilement conciliable avec ce que l'on sait sur l'activation du chymotrypsinogène. Tous les autres échantillons de néochymotrypsinogènes (Néo-Ala, Néo-Thr et Néo(Ala, Sér)) préparés ultérieurement ont donné des activités spécifiques de l'ordre de 2.4. On notera également que les chiffres cités dans le présent travail à propos des activités spécifiques des chymotrypsines n'ont pas une grande signification en valeur absolue car ils dépendent beaucoup des conditions expérimentales adoptées et d'une série de conventions¹. Ils sont néanmoins strictement comparables car les conditions et les conventions sont restées les mêmes pendant tous les essais.

lui donne naissance n'est pas aussi active que la chymotrypsine- π . Elle doit donc en toute logique autolyser sa liaison leucylsérine à un rythme plus lent.

B. Le néochymotrypsinogène à alanine et sérine N-terminales (Néo(Ala,Ser))

Nous venons de voir que toutes les chymotrypsines sont capables d'hydrolyser dans leur propre molécule une liaison leucyl-sérine (liaison (2)) à une vitesse plus ou moins grande. Il est donc permis de penser que les chymotrypsines sont également capables de rompre la même liaison au sein du chymotrypsinogène et d'attribuer par conséquent à cette rupture la présence de sérine N-terminale dans certains hydrolysats chymotrypsiques du Tableau I. Une telle hypothèse est intéressante car la liaison (2) est toute proche de la liaison (1) dont la rupture provoque l'activation du zymogène.

Le néochymotrypsinogène (Ala,Ser) n'a pas encore pu être cristallisé. Quand on traite dans les conditions déjà décrites l'hydrolysat correspondant à la colonne 5 du Tableau I, on recueille tout au plus 10% des protéines à l'état de cristaux. Ces cristaux contiennent beaucoup d'alanine N-terminale et peu de sérine. Ils sont donc séparés par filtration et la solution claire restante est dialysée contre HCl N/1000 puis lyophilisée. La préparation sur laquelle nous avons travaillé contenait 0.3 résidu de sérine N-terminale par mole. Le traitement trypsique lui conférait une activité spécifique de 2.3 environ (Fig. 2).

La meilleure façon de montrer que le résidu N-terminal de sérine est bien celui de la liaison (2) consiste à trouver un résidu d'arginine à côté de lui. On a donc hydrolysé partiellement le dérivé dinitrophényl de Néo(Ala,Ser) et on a cherché à identifier la DNP-sérylarginine parmi les DNP-peptides acido-solubles engendrés par cette hydrolyse. La recherche a été vaine. La liaison arginyl-sérine est vraisemblablement moins stable dans HCl concentré que toutes les liaisons qui lui font suite le long de la chaîne. Il se forme donc, soit de la DNP-sérine, soit des DNP-peptides relativement longs dont le comportement chromatographique est peu favorable. Devant cet échec, nous avons eu recours à une autre technique consistant à rompre spécifiquement la liaison arginyl-isoleucine par la trypsine. Si la liaison leucyl-sérine est déjà rompue au sein de Néo(Ala,Ser), la libération de la sérylarginine doit être immédiate. Dans le cas contraire, elle doit être lente puisqu'elle résulte de l'autolyse assez paresseuse d'une chymotrypsine de type α . Afin de rendre l'expérience plus démonstrative, nous avons encore ralenti cette autolyse en ajoutant du β -phénylpropionate^{2,4} au mélange d'activation. Au bout d'1 h, l'activation est d'environ 60% et on peut doser 0.25 mole de sérylarginine libre. L'activation du chymotrypsinogène en aurait dans les mêmes conditions libéré 0.08 au maximum². 0.17 mole de sérylarginine semble donc avoir été libérée immédiatement, alors qu'on en attendait $0.3 \times 0.6 = 0.18$. Une telle concordance, retrouvée dans plusieurs expériences, n'est pas fortuite. Elle démontre que la liaison (2) est bien ouverte dans Néo(Ala,Ser).

Or, par définition même, Néo(Ala,Ser) est inactif. Notre étude sur les néochymotrypsinogènes d'origine chymotrypsique nous permet donc de faire trois observations intéressantes: d'une part, deux classes de protéines ne possédant pas exactement la même structure (le chymotrypsinogène et les néochymotrypsinogènes) acquièrent une activité chymotrypsique grâce à l'ouverture de la même liaison (liaison (1)). D'autre part, l'ouverture d'une liaison très voisine (liaison (2)), séparée de la première par deux résidus seulement, ne provoque pas l'activation. Enfin, on peut altérer la structure du chymotrypsinogène en ouvrant les liaisons (2), (3) et (4) sans faire pour

autant disparaître l'aptitude de la molécule à être activée. L'ouverture des liaisons (3) et (4) détermine néanmoins une baisse d'environ 40% de l'activité potentielle de cette molécule.

Les deux premières observations sont en quelque sorte complémentaires car elles montrent toutes deux l'extrême spécificité du phénomène d'activation. Nous ne savons pas encore si l'on fait disparaître la capacité d'activation de la molécule dès qu'on lui enlève la séquence arginyl-isoleucine. Mais nos expériences suggèrent que, tant que cette séquence subsiste, c'est sa rupture et non celle de la séquence immédiatement voisine, qui déclenche l'activation.

III. LE PEPTIDE THRÉONYLASPARAGINE

On sait que l'activation "lente" du chymotrypsinogène se différencie de l'activation "rapide" par certaines protéolyses additionnelles² auxquelles la lenteur du phénomène donne l'occasion de se manifester. Tout ce qui vient d'être dit suggère avec insistance que ces protéolyses sont justement celles qui interviennent pendant la conversion du chymotrypsinogène en néochymotrypsinogènes (rupture des liaisons (3) et (4)). Nous allons maintenant le confirmer de façon définitive en étudiant systématiquement les peptides spécifiques prenant naissance dans l'un et l'autre cas.

Quelques résultats préliminaires concernant ces peptides ont déjà été publiés⁷. Ils ont été confirmés et complétés par une série de nouvelles expériences dont on trouvera ci-après la description succincte:

Les mélanges obtenus à l'issue de l'attaque chymotrypsique du chymotrypsinogène (Tableau I) ou de l'activation "lente"⁷ sont traités par du diisopropylfluorophosphate pour arrêter la protéolyse au moment voulu. Un volume de solution correspondant à environ 10 μ mole de zymogène est amené à pH = 3 et dialysé pendant 48 h à 4° contre 3 \times 25 ml d'eau. Le dialysat est concentré rapidement dans un évaporateur rotatif. Puis il est additionné peu à peu de NaOH *N* et maintenu sous vide en présence de SO₄H₂ 66° Bé*. Le résidu est oxydé** par l'acide performique²¹, dissout dans un tampon citrate 0.2 *N* à pH 3.25 et chromatographié²² dans une colonne de 1.1 \times 87 cm de Dowex 50 \times 4 forme Na⁺. L'élution est effectuée par 120 ml de tampon citrate 0.2 *N* pH 3.25 puis par 480 ml d'un liquide résultant du mélange progressif dans un récipient de 330 ml d'un tampon citrate 0.2 *N* pH 3.25 et d'un tampon 2 *N* pH 5.19. A ce moment, l'élution peut être considérée comme terminée. Le passage ultérieur de liquides plus alcalins (bicarbonate, carbonate et soude) à travers la colonne ne ferait sortir aucune quantité appréciable de substances ninhydrine-positives. L'effluent est recueilli en fractions de 1 ml.

On procède alors au tracé du diagramme. On vérifie l'absence de peptides faiblement réactifs vis à vis de la ninhydrine en soumettant à l'hydrolyse alcaline quelques fractions judicieusement choisies et on étudie enfin la composition et la pureté de tous les pics importants. Cette étude est réalisée en prélevant des fractions au sommet et dans les branches ascendante et descendante de chaque pic. Les fractions sont dessalées*** de la façon suivante: Une partie aliquote correspondant à 0.5–1.0 μ -équivalent de leucine est amenée à pH 3.0 et elle est passée à travers une petite colonne (1.1 \times 2.0 cm) de Dowex 50 \times 2 forme NH₄⁺. La colonne est lavée avec 15 ml d'acide acétique 0.2 *N* puis elle est éluée par 10 ml d'un mélange acétate d'ammonium-ammoniaque

* Ce traitement a pour objet d'éliminer les ions NH₄⁺ provenant du sulfate d'ammonium (voir Tableau I).

** L'oxydation performique a pour but de transformer en peptides de l'acide cystéique les peptides de la cystine dont le comportement chromatographique est assez aberrant. Il est d'ailleurs peu vraisemblable que l'activation "lente" engendre de tels peptides car le chymotrypsinogène et la chymotrypsine- α possèdent le même nombre de résidus cystine¹⁵. Nos expériences le confirment nettement.

*** Ce dessalage est inutile quand on utilise pendant la chromatographie des solutions d'acétate d'ammonium au lieu de solutions de citrate.

§ Cette technique nous a été indiquée par Dr. S. MOORE dans une communication personnelle. Tous les aminoacides, même l'arginine, sont élués par 10 ml de solution. Aucun des peptides qui nous intéressent n'est donc perdu pendant cette élution.

de pH 10.9 et de force ionique 0.04 $\frac{1}{2}$. L'acétate d'ammonium et l'ammoniaque sont éliminés sous vide, le résidu est repris dans un peu d'eau et la solution est séparée en deux parties. La 1 $^{\circ}$ est chromatographiée sur papier dans le système butanol-acide acétique-eau (4-1-5). La 2 $^{\circ}$ est hydrolysée et l'hydrolysât est étudié sur papier dans le système le plus convenable. Quand la chromatographie des peptides révèle l'existence de plusieurs taches, chaque tache est éluee et hydrolysée séparément. Les résidus N-terminaux de chaque peptide sont déterminés par la technique de SANGER. Un pic quelconque n'est déclaré pur qu'à une triple condition: donner une seule tache par chromatographie directe; donner par hydrolyse un mélange relativement simple d'acides aminés en proportions à peu près stoechiométriques; enfin posséder un seul résidu N-terminal.

Toutes ces expériences ont montré que*:

(a) La conversion du chymotrypsinogène en Néo-Ala est bien accompagnée par la libération d'un seul peptide. Ce peptide est la thréonylasparagine (et non l'acide thréonylaspartique) car il engendre 1.01 mole d'ammoniaque par hydrolyse alcaline ménagée²³ et il migre comme l'asparagine pendant une électrophorèse sur papier à pH = 6.5 dans le système acide acétique-pyridine-eau. A l'apparition de 0.6 mole d'alanine N-terminale (Tableau I) correspond la formation de 0.5 mole de peptide. Le schéma proposé pour la genèse des néochymotrypsinogènes (voir plus haut) est donc pleinement confirmé.

(b) Le diagramme relatif à l'activation "lente" du chymotrypsinogène contient 4 pics. Le premier renferme de la thréonylasparagine (0.6 mole pour 0.7 résidu d'alanine N-terminale) et le dernier renferme de la sérilarginine. L'un des pics intermédiaires contient exclusivement de l'ammoniaque (pic B de notre précédente note⁷) et l'autre (pic A) est un mélange d'au moins 3 peptides: Leu**·Gly, Leu**·Ser et Leu**·Ala. Les proportions respectives de ces peptides ne dépassent pas 0.1 mole par mole de zymogène. L'activation "lente" du chymotrypsinogène libère donc en fait deux peptides seulement: la sérilarginine, c'est à dire le peptide formé pendant l'activation "rapide" au moment de la substitution du résidu N-terminal d'arginine par la leucine² et la thréonylasparagine, c'est à dire le peptide formé par la chymotrypsine au moment de la substitution du résidu N-terminal de thréonine par l'alanine. Le caractère mixte de ce mode d'activation apparaît ainsi clairement.

IV. MÉCANISME DE L'ACTIVATION "LENTE" DU CHYMOTRYPSINOGENE

Quand on coupe au sein d'une molécule protéique quatre liaisons peptidiques successivement et dans un ordre quelconque, 2⁴ = 16 possibilités nous sont offertes. La première correspond à l'état initial, c'est à dire à la protéine dans laquelle aucune liaison n'a encore été coupée. Les 15 autres sont trouvées en associant 1 par 1, 2 par 2, 3 par 3 et 4 par 4 les quatre ruptures envisagées. La Fig. 4 donne un aperçu de ces 15 possibilités. Il est intéressant de savoir ce qu'elles signifient dans le cas particulier du chymotrypsinogène.

Notons tout d'abord que les 15 possibilités de la Fig. 4 ne sont à considérer que si les 4 ruptures interviennent dans un ordre *quelconque*. Pendant l'activation "rapide", la rupture trypsique de la liaison (1) est quasi-immédiate et elle est suivie aussitôt par l'autolyse de la liaison (2). Le phénomène est donc simple. Il consiste à convertir le chymotrypsinogène successivement en deux protéines (chymotrypsines- π et δ), la

* Voir les diagrammes chromatographiques dans l'une de nos précédentes notes⁷. Ces diagrammes, obtenus avec des techniques moins perfectionnées, sont néanmoins complets.

** ou Ileu.

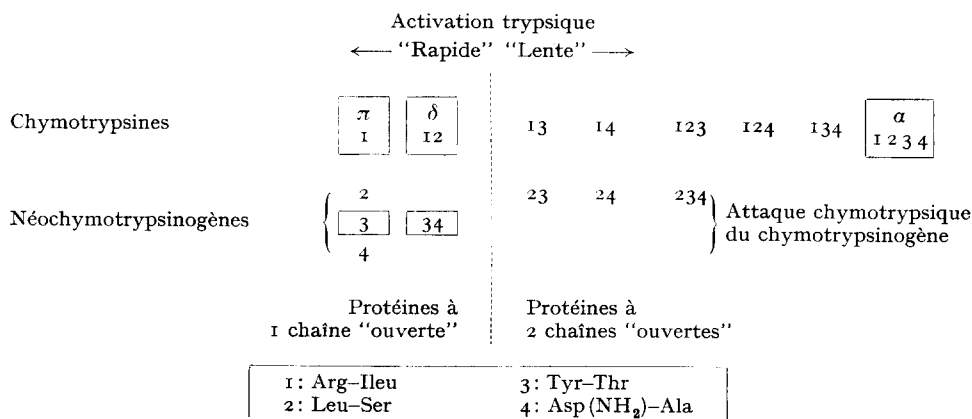


Fig. 4. Possibilités offertes par la rupture de quatre liaisons dans le chymotrypsinogène. On a encadré les possibilités correspondant à des protéines d'ores et déjà caractérisées de façon complète. Ces protéines sont au nombre de 5: chymotrypsines π , δ et α ; néochymotrypsinogènes Néo-Ala et Néo-Thr. En outre, l'existence de deux autres protéines est extrêmement probable: chymotrypsine α_1 (123) et néochymotrypsinogène (Ala, Ser) (234).

seconde (la chymotrypsine- δ) représentant le terme ultime et relativement stable de la conversion. Pendant l'activation "lente" au contraire, la lenteur des phénomènes introduit un élément de désordre. D'une part, l'hydrolyse trypsique n'est plus forcément terminée avant le démarrage des hydrolyses chymotrypsiques. D'autre part, ces hydrolyses chymotrypsiques, qui affectent cette fois 3 liaisons, ne s'effectuent pas forcément selon un ordre immuable et elles ne sont pas non plus forcément échelonnées de façon rigoureuse dans le temps. Les mélanges engendrés sont donc complexes. Ils peuvent contenir du chymotrypsinogène, des néochymotrypsinogènes, de la chymotrypsine- δ et une série de chymotrypsines de type α^* .

Les 15 possibilités de la Fig. 4 ne sont néanmoins pas également probables. Les plus probables correspondent aux protéines que l'on a le plus de chances de rencontrer. Etant donné que la rupture de la liaison (1) détermine l'activation, les 8 protéines de la 1^{re} ligne de la Fig. 4 doivent être des chymotrypsines. Sur ces 8 chymotrypsines, 3 sont parfaitement caractérisées (π (1), δ (12) et α (1234)**). L'existence d'une quatrième, la chymotrypsine- α_1 (123)⁷, est rendue vraisemblable par la présence de thréonine N-terminale dans les protéines de l'activation "lente". Les 7 autres possibilités mentionnées dans la Fig. 4 correspondent en principe à des néochymotrypsinogènes. Les protéines (3), (34) et (234) sont, respectivement, Néo-Thr, Néo-Ala et Néo(Ala, Ser).

Considérons maintenant les positions respectives occupées par les liaisons rompues. Deux cas peuvent se présenter: ou bien deux liaisons voisines sont coupées (Ex.: liaisons (1) et (2) ou (3) et (4)). Un peptide court est alors libéré (Ser·Arg ou Thr·Asp(NH₂)) et l'ablation de cette portion somme toute infime de la molécule n'a aucune influence sur son activité actuelle ou potentielle. La chymotrypsine- δ a en

* Ne nous étonnons donc pas que la chymotrypsine- α de NORTHROP ET KUNITZ soit obtenue avec un rendement assez mauvais et qu'elle soit encore électrophorétiquement impure après plusieurs cristallisations⁸.

** La première chymotrypsine isolée, la chymotrypsine- α , exige en fait le nombre maximum de ruptures, soit 4.

effet la même activité que la chymotrypsine- π . Néo-Ala a la même activité potentielle que Néo-Thr. Ou bien, les liaisons rompues sont loin les unes des autres (Ex. : liaisons (1) et (3)). Nous ne savons pas au juste quelle distance sépare ces liaisons. Mais nous pouvons supposer qu'un pont interne se trouve entre elles car leur rupture fait apparaître, non pas des peptides libres, mais des chaînes "ouvertes" qui font toujours partie de la molécule protéique. Cette molécule subit alors une modification sensible de structure, qui influe sur son comportement biochimique. Les chymotrypsines de type α sont caractérisées par une chaîne "ouverte" supplémentaire. Leur activité spécifique est inférieure à celle des chymotrypsines π et δ .

La Fig. 5 propose pour terminer un schéma général de l'activation du chymotrypsinogène. Deux routes y sont prévues. L'une, vraisemblablement prédominante quand les quantités de trypsine sont très fortes, passe par les chymotrypsines de l'activation "rapide", lesquelles s'autolysent* ensuite pour donner les chymotrypsines de l'activation "lente". L'autre, vraisemblablement prédominante quand les quantités de trypsine sont très faibles, passe par les néochymotrypsinogènes. Rien n'empêche de supposer que, dans tous les cas intermédiaires, ces deux routes soient simultanément utilisées.

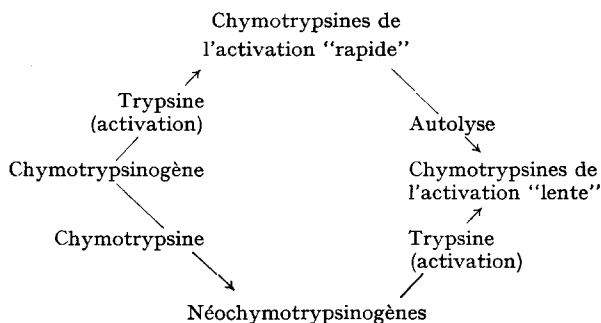


Fig. 5. Schéma général de l'activation du chymotrypsinogène.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame A. GUIDONI dont l'aide très compétente sur le plan technique ne nous a jamais fait défaut. Nous remercions aussi le Centre National de la Recherche Scientifique et la Fondation Rockefeller pour les subventions généreuses qui ont grandement facilité la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

1. Le chymotrypsinogène est lentement hydrolysé par la chymotrypsine au niveau de 3 liaisons (tyrosyl-thréonine, leucyl-sérine et asparaginy-alanine). Ces hydrolyses engendrent des formes dégradées et encore activables, pour lesquelles le nom de "néochymotrypsinogène" est proposé. 3 néochymotrypsinogènes sur les 7 en principe concevables, ont été caractérisés au cours du présent travail. Le sulfate d'ammonium incite la chymotrypsine à rompre la liaison asparaginy-alanine, laquelle ne semble pas correspondre exactement aux besoins structuraux de l'enzyme.

2. L'activation des néochymotrypsinogènes résulte, comme celle du chymotrypsinogène

* L'autolyse de la chymotrypsine- δ avait échappé à JACOBSEN²⁴. Le présent travail n'y fait d'ailleurs pas allusion de façon précise. Mais l'une de nos communications précédentes⁷ a montré que cette autolyse existe réellement et qu'elle fait apparaître en position terminale les mêmes résidus que l'attaque chymotrypsique du chymotrypsinogène.

ordinaire, de la rupture d'une liaison arginyl-isoleucine par la trypsine. Cette activation (ainsi d'ailleurs que l'autolyse de la chymotrypsine- δ) engendre les chymotrypsines de type α . Ces chymotrypsines, théoriquement au nombre de 5, possèdent une chaîne "ouverte" de plus que les chymotrypsines- π et δ . Les remaniements de structure qu'implique la formation de la nouvelle chaîne provoque une diminution d'environ 40 % de l'activité actuelle ou potentielle des molécules.

3. Il est remarquable de constater que la rupture par la chymotrypsine d'une liaison leucyl-sérine séparée de la liaison arginyl-isoleucine par deux résidus seulement n'active pas le zymogène. Ce fait démontre l'extrême spécificité du phénomène d'activation.

SUMMARY

1. Chymotrypsinogen is slowly hydrolysed by chymotrypsin at three bonds (tyrosyl-threonine, leucyl-serine and asparaginyl-alanine). These hydrolyses give degraded forms, which can still be activated and for which the name "neochymotrypsinogens" has been proposed. Three of the seven possible neochymotrypsinogens have been described in the course of the present work. Ammonium sulphate induces chymotrypsin to break the asparaginyl-alanine bond, which does not seem to fit exactly the structural requirement of the enzyme.

2. As in the case of ordinary chymotrypsinogen, activation of the neochymotrypsinogens is a result of the cleavage of an arginyl-isoleucine linkage by trypsin. This activation (like the autolysis of chymotrypsin- δ) produces chymotrypsins of the α type. These chymotrypsins, theoretically five in number, have one "open" chain more than the chymotrypsins- π and δ . The alterations in structure which the formation of the new chain involves, cause a diminution of about 40 % in the actual or potential activity of the molecules.

3. It is remarkable to note that cleavage by chymotrypsin of a leucyl-serine bond separated from the arginyl-isoleucine bond by only two residues, does not activate the zymogen. This fact shows the extreme specificity of the activation phenomenon.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.
- ² M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 565.
- ³ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Proc. Third Intern. Congr. Biochem.*, Brussels, 1955, p. 78.
- ⁴ F. R. BETTELHEIM ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 241.
- ⁵ W. J. DREYER ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 814.
- ⁶ P. DESNUELLE ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 181.
- ⁷ M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 571.
- ⁸ M. ROVERY, A. YOSHIDA ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 404.
- ⁹ B. J. JANDORF, *Federation Proc.*, 9 (1950) 186.
- ¹⁰ H. J. SHINE ET C. NIEMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 4275.
- ¹¹ C. GABELOTEAU-FABRE ET P. DESNUELLE, observations inédites.
- ¹² N. M. GREEN, J. A. GLADNER, L. W. CUNNINGHAM, Jr. ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2122.
- ¹³ F. C. WU ET M. LASKOWSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 110.
- ¹⁴ A. BRONFENBRENNER, K. LINDERSTRØM-LANG ET M. OTTESEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 408.
- ¹⁵ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, 2nd Ed., Columbia University Press, New York, 1948.
- ¹⁶ J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 911.
- ¹⁷ E. L. SMITH, R. LUMRY ET W. J. POLGLASE, *J. Phys. & Colloid Chem.*, 55 (1951) 125.
- ¹⁸ F. SANGER, *Biochem. J.*, 45 (1949) 563.
- ¹⁹ R. MONIER ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 62.
- ²⁰ R. ACHER, U. R. LAURILA ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 97.
- ²¹ E. SCHRAM, S. MOORE ET E. J. BIGWOOD, *Biochem. J.*, 57 (1954) 33.
- ²² S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- ²³ F. SANGER, E. O. P. THOMPSON ET R. KITAÏ, *Biochem. J.*, 59 (1955) 509.
- ²⁴ C. F. JACOBSEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 25 (1947) 325.

Reçu le 20 juillet 1956