

Purification du trypsinogène et de la trypsine de boeuf par chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose

Les préparations commerciales de trypsinogène et de trypsine de boeuf, cristallisées selon des techniques pourtant classiques¹, sont notoirement impures. La recristallisation du trypsinogène en présence de DFP est aléatoire et rarement utilisée². On s'efforce à l'heure actuelle de purifier les deux protéines en soumettant les produits cristallisés à diverses chromatographies sur Amberlite IRC-50 ou CM-cellulose³⁻⁶.

Le désavantage des colonnes d'Amberlite est leur faible capacité vis à vis des protéines. La chromatographie de la trypsine sur cette résine⁵ paraît en outre exiger la présence d'urée 8 M. La technique est donc peu pratique et la trypsine "renaturée" qu'elle permet d'obtenir n'est peut-être pas identique à la trypsine native. D'autre part, la chromatographie du trypsinogène et de la trypsine sur CM-cellulose n'a été réalisée jusqu'ici qu'à pH 3.2 (réf. 6). Un pH aussi bas supprime tout danger d'auto-activation ou d'autolyse. Mais il diminue le pouvoir résolutif des colonnes. Le trypsinogène par exemple ne peut-être nettement séparé ni de la trypsine ni du chymotrypsinogène-A à ce pH. L'expérience acquise avec les précurseurs du porc⁷ nous a incités à entreprendre une étude complète de la chromatographie des précurseurs du boeuf sur CM-cellulose. On trouvera ci-après quelques résultats préliminaires concernant l'obtention du trypsinogène à partir des eaux-mères de cristallisation du chymotrypsinogène-A et la purification de la trypsine cristallisée commerciale. Dans le paragraphe consacré au trypsinogène, toutes les activités sont potentielles, en ces sens qu'elles ne se manifestent qu'après activation trypsique. Dans le paragraphe de la trypsine, au contraire, les activités sont mesurées directement.

Obtention du trypsinogène. Au lieu de cristalliser le trypsinogène¹ à partir des eaux-mères laissées par la cristallisation du chymotrypsinogène-A, il paraît plus commode et plus efficace de chromatographier les protéines de ces eaux-mères dans les conditions suivantes: Le précipité obtenu en portant à 0.8 la saturation des eaux-mères en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est dialysé contre l'acide acétique 0.08 M et lyophilisé. 90 ml de la solution froide de 1.5 g de protéine dans l'acétate d'ammonium 0.08 M à pH 6.6 sont introduits dans une colonne (3 × 50 cm; V_i^* , 140 ml; débit, 90 ml/h; temp. 5°) de CM-cellulose (0.49 milliéquiv. acides/g; pK, 5.2) équilibrée avec le tampon précédent. Au moment indiqué par une flèche dans le diagramme de la Fig. 1, la molarité du tampon est portée à 0.15. Dans les fractions (70 ml), on dose les protéines par spectrophotométrie^{**} et les activités*** BAEE et ATEE par une technique potentiométrique déjà décrite⁸.

Le diagramme de la Fig. 1 montre que la tampon 0.08 M élue deux pics actifs vis à vis de ATEE. L'un au moins de ces pics contient vraisemblablement une partie du chymotrypsinogène-B qui n'a pas été éliminé par le fractionnement préalable avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et par la cristallisation du chymotrypsinogène-A. La tampon 0.15 M fait ensuite sortir un pic important (37 % des protéines totales) qui contient le trypsinogène. Les 4 fractions du sommet sont aussitôt amenées à pH 3. Après précipitation

Abbréviations: ATEE, acétyl-L-tyrosine éthyl ester; BAEE, benzoyl-L-arginine éthyl ester.
* Volume interstiel (ou volume mort) des colonnes.

** E_1^1 % à 280 μm : 13.9 pour le trypsinogène, 14.4 pour la trypsine et 21.5 pour la chymotrypsine.

*** Exprimées en milliéquiv./min. Les activités spécifiques sont rapportées à 1 mg d'azote protéique (N: 15.0 % pour la trypsine et 16.2 % pour la chymotrypsine).

dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0.7 saturation, dialyse contre $\text{HCl } 10^{-3} M$ et lyophilisation, on obtient finalement 360 mg d'une précurseur plus pur que le trypsinogène cristallisé (activité spécifique, 0.34 au lieu de 0.26) et aussi plus stable au cours d'un stockage prolongé à -15° . Il est entièrement dépourvu de chymotrypsinogène-A et de trypsin que seraient élusés plus loin sur la droite du diagramme. Par contre, le trypsinogène ne se sépare pas dans nos conditions de certaines protéines inactives, appelées "protéines inertes" par KUNITZ¹ et prenant naissance pendant l'autoactivation du trypsinogène. Mais la formation de ces protéines ne serait à craindre que si, malgré la présence d'inhibiteurs de trypsin, le trypsinogène s'activait partiellement au cours même de la chromatographie.

Purification de la trypsin cristallisée. La Fig. 2 donne le diagramme analytique obtenu avec une solution froide de 17 mg de trypsin cristallisée commerciale (Worthington, lyophilized crystalline) dans 1.5 ml de tampon pH 6.02 0.05 M en citrate de sodium et 0.013 M en CaCl_2 . La colonne (0.7 \times 9 cm; V_t , 1.4 ml; débit, 5 ml/h; temp., 5°) de CM-cellulose est équilibrée avec le tampon précédent. La flèche indique le moment où la molarité en citrate du tampon est portée à 0.1. Les fractions sont de 1.4 ml.

La Fig. 2 indique que la trypsin est élue par le tampon 0.1 M sous la forme d'un pic régulier dont toutes les fractions ont une activité spécifique de 0.31. Cette valeur représente un gain d'environ 20% sur l'activité de la trypsin cristallisée (0.25 environ). Elle s'accorde bien avec l'activité potentielle du trypsinogène obtenu

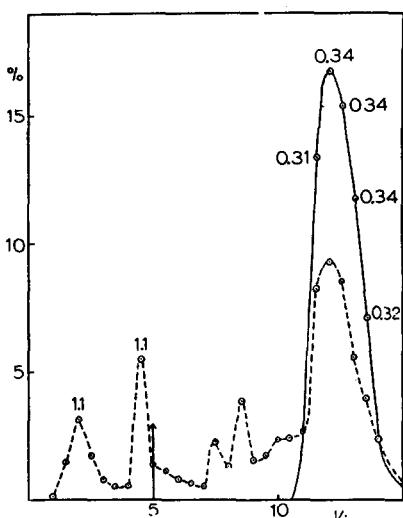


Fig. 1. Obtention du trypsinogène à partir des eaux-mères de cristallisation du chymotrypsinogène-A. Abscisses, volume d'éluat exprimé en nombre de V_t . Ordonnées, activité BAEE (trait plein) et protéines (pointillé) des fractions, en % des quantités totales introduites dans la colonne. Les nombres indiquent les activités spécifiques (ATEE pour les 2 premiers pics; BAEE pour le 3^{ème}). Rendement de la chromatographie: 73% en protéines et 75% en trypsinogène.

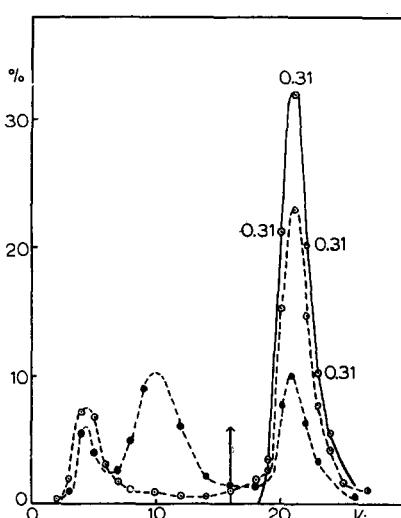


Fig. 2. Purification de la trypsin cristallisée. Mêmes abscisses que Fig. 1. Ordonnées, activité BAEE (trait plein), activité ATEE (pointillé et cercles noirs) et protéines (pointillé et cercles blancs) des fractions, en % des quantités totales introduites dans la colonne. Les nombres indiquent les activités spécifiques BAEE des fractions du pic principal. Ces fractions sont amenées à pH 3 dès leur sortie de la colonne.

précédemment. La trypsine peut donc être purifiée sur CM-cellulose, sans qu'il soit nécessaire d'opérer à un pH anormalement bas ou de dénaturer la protéine par l'urée. L'autolyse de la trypsine est d'ailleurs très lente dans les conditions expérimentales adoptées pour la chromatographie.

Cette augmentation d'activité spécifique a pour contre partie la séparation d'un pic dépourvu d'activité BAEF et représentant 25 % des protéines. Situé sur la gauche du diagramme, ce pic contient vraisemblablement les "protéines inertes" dont il a été fait mention précédemment et qui, n'ayant pas perdu l'hexapeptide Val-(Asp)₄-Lys (réf. 9), sont moins cationiques que la trypsine.

Notons enfin que toutes les fractions du diagramme manifestent une certaine activité ATEE qui sort de la colonne en 3 pics distincts. Les 2 premiers sont sans doute de la chymotrypsine ou un enzyme analogue ayant accompagné la trypsine dans ses cristallisations. Mais le 3ème (35 % de l'activité ATEE totale) est exactement coaxial avec celui de la trypsine (activité spécifique ATEE de toutes les fractions, 0.05). Ce résultat est compatible avec l'idée, déjà suggérée d'ailleurs par des études cinétiques en présence d'inhibiteurs¹⁰, que la trypsine possède une activité ATEE propre qui, d'après nos expériences, serait environ 2 % de celle de la chymotrypsine-A cristallisée. Il pourrait expliquer pourquoi la trypsine, même après divers traitements, coupe parfois au sein des protéines des liaisons réservées d'ordinaire à la chymotrypsine.

Les résultats concernant le pourcentage d'impuretés dans la trypsine cristallisée et la manifestation probable par cet enzyme d'une activité ATEE propre sont analogues à ceux trouvés indépendamment par COLE ET KINKADE⁵ au moyen d'une technique différente.

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

S. MAROUX
M. ROVERY
P. DESNUELLE

¹ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline enzymes*, 2ième Ed., Columbia Univ. Press, New York, 1948.

² F. TIETZE, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 1.

³ H. H. TALLAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 407.

⁴ P. J. KELLER, E. COHEN ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 344.

⁵ R. D. COLE ET J. M. KINKADE, Jr., *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2443.

⁶ I. E. LIENER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 88 (1960) 216.

⁷ M. ROVERY, M. CHARLES, O. GUY, A. GUIDONI ET P. DESNUELLE, *Bull. soc. chim. biol.*, 42 (1960) 1235.

⁸ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.

⁹ C. GABELLOTEAU ET P. DESNUELLE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 475.

¹⁰ T. INAGAMI ET J. M. STURTEVANT, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1019.

Reçu le 30 octobre, 1961

Biochim. Biophys. Acta, 56 (1962) 202-204