

L'ÉNERGIE DE FORMATION DES COMPLEXES DISSOCIABLES ENZYME-SUBSTRAT ET ANTIGÈNE-ANTICORPS

par

RENÉ WURMSER ET SABINE FILITTI-WURMSER

Institut de Biologie physicochimique, Paris (France)

I. LES COMPLEXES ENZYME-SUBSTRAT

La connaissance des énergies et entropies de formation des complexes protéiques dissociables permettrait de préciser la nature des liaisons qui y sont impliquées, et de comprendre l'effet spécifique qui en résulte.

Ainsi l'action catalytique des enzymes est généralement expliquée par une attraction entre l'enzyme et le substrat. Plusieurs mécanismes de détail ont été proposés¹. Par exemple, l'attraction de deux substrats juxtaposés sur l'enzyme les presse l'un contre l'autre et favorise leur union. Dans une représentation plus élaborée de l'activation, STEARN² considère l'hydrolyse d'une liaison peptide. La formation du groupe d'atomes activé CONH serait facilitée par l'approche d'un dipole de l'enzyme qui attire l'oxhydrile vers le groupe C-N. L'attraction du substrat par l'enzyme servirait à vaincre les forces de répulsion qui s'opposent à ce rapprochement.

D'autre part, on peut admettre que l'abaissement de l'énergie d'activation ne dépend pas directement de la combinaison de l'enzyme avec le substrat, pris comme un tout et dans son état normal. L'énergie potentielle de l'état activé serait abaissée par résonance d'un groupe réactif du substrat dans l'état activé avec un groupe correspondant de l'enzyme. Le mécanisme suggéré par DELBRÜCK³ pour expliquer l'autoreproduction des protéines s'apparente à cette manière de voir. La connaissance exacte des énergies de liaison serait utile pour entreprendre une discussion serrée de ces deux conceptions.

Or, on ne possède pas de données certaines sur les énergies d'association des enzymes avec leur substrats. Celles dont on dispose jusqu'ici ont été obtenues en appliquant la loi de Van 't Hoff à la variation de la constante de Michaelis en fonction de la température. Comme l'ont mis en évidence BRIGGS ET HALDANE¹, cette constante K_M n'est pas nécessairement égale à l'inverse de la constante d'affinité K de l'enzyme pour son substrat. La variation de K_M avec la température ne peut donc servir sans réserves à calculer la chaleur de formation à pression constante ou enthalpie ΔH du composé. La condition est que la vitesse k_1 de la dissociation du composé ES en E et S, soit grande par rapport à la vitesse k_2 de décomposition du complexe en produit final de la réaction, ou que la décomposition du complexe ait la même énergie d'activation que sa dissociation.

La constante d'affinité K de l'enzyme pour son substrat a bien été déterminée directement, dans une circonstance, par CHANCE⁴. Elle est 100 fois plus grande que $1/K_M$. Il

s'agit de la peroxydase et du peroxyde d'hydrogène dont l'union donne un composé caractérisé par son spectre d'absorption. Malheureusement la variation de la constante avec la température n'a pas été déterminée, si bien que même dans ce cas on n'a pas encore l'enthalpie. La technique employée par CHANCE est d'ailleurs restreinte aux associations enzyme-substrat qui ont un spectre d'absorption caractéristique.

Une autre technique, applicable spécialement aux associations des enzymes avec de grosses molécules, peut être fondée sur une autre propriété. On sait mesurer, en principe, les poids moléculaires à partir de l'intensité de la lumière diffusée et tirer des indications sur les dimensions des molécules à partir de la distribution angulaire de cette intensité. Cette technique, actuellement mise en œuvre dans notre laboratoire, pourra être appliquée aux complexes formés entre les enzymes protéolytiques et leur substrat.

II. L'UNION DE L'AGGLUTININE AUX HÉMATIES

1. Equilibre de l'agglutination

Pour un autre type de complexes protéiques dissociables, celui formé par un antigène avec un anticorps, une mesure directe de la chaleur dégagée a été effectuée par BOYD et ses collaborateurs⁵. Ces auteurs ont trouvé que la combinaison de l'hémocyanine avec son anticorps chez le cheval, dégage 40 000 calories par molécule d'antihémocyanine.

On a depuis ARRHENIUS cherché à obtenir la chaleur de réaction à partir de l'effet de la température sur l'équilibre qui s'établit entre antigènes et anticorps. La difficulté est d'expliquer la relation qui unit les constantes d'équilibre à la composition du complexe formé. En particulier, les résultats dépendent de l'idée que l'on se fait de la structure de ce complexe, de la valence des constituants, et des interactions entre les groupes réactifs d'une même molécule.

Nous avons pensé que le procédé statistique le plus simple pouvait être appliqué à l'isohémagglutination. Celle-ci étant une réaction de surface, on devait être à même de calculer, avec un minimum d'hypothèses, la relation existante entre la grandeur observée et une constante d'équilibre. Ce phénomène présentait en outre l'avantage que sa réversibilité avait été très sûrement prouvée.

Soit τ le taux d'agglutination, c'est-à-dire, en appelant N_l le nombre d'hématies libres, le rapport entre le nombre des hématies agglutinées ($N_o - N_l$) et le nombre total d'hématies N_o . FILITTI-WURMSER ET JACQUOT-ARMAND⁶ ont établi que, par numération dans un hématimètre, l'erreur standard sur le taux d'agglutination varie entre 0.3% pour $\tau = 0.99$ et 7% pour $\tau = 0.45$. La technique est donc utilisable pour une étude quantitative. Elle a servi à démontrer la réversibilité de l'agglutination par les faits suivants.

a) *Dissociation de l'agglutinat.* On obtient le même état d'équilibre quand on agglutine des hématies ou quand on dissocie un agglutinat.

Pour le prouver on mélange dans une première opération un sérum avec un nombre donné d'hématies et une solution tampon de manière à avoir un volume V. On obtient un certain taux d'agglutination. Dans une deuxième opération on mélange le même sérum avec le même nombre d'hématies et une quantité de solution tampon telle que le volume v est plus petit que V. Il se forme un agglutinat plus abondant. Lorsque celui-ci a atteint son équilibre, on dilue jusqu'au volume V. Le nouveau taux d'agglutination qui s'établit est égal à celui obtenu dans la première opération.

b) *Déplacement de l'équilibre par la température.* Lorsque, à un sérum donné, on ajoute des quantités croissantes d'hématies, on obtient, suivant la température à laquelle on opère, les résultats représentés par la Fig. 1. Sur ce diagramme on a porté en abscisses $\log N_o$ et en ordonnées $\log (N_o - N_b)$. On voit que le nombre maximum d'hématies agglutinées augmente quand la température s'abaisse.

En outre, le taux d'agglutination est d'abord voisin de l'unité (portion linéaire des courbes) à toutes les températures, mais au-delà d'une certaine valeur de N_o , le taux d'agglutination est nettement plus élevé quand la température est plus basse. On peut mettre en évidence le déplacement réversible de l'équilibre par le fait qu'un même taux d'agglutination est atteint soit directement à 37° , soit après une mise en équilibre à 5° suivie d'une dissociation partielle de l'agglutinat à 37° .

Fig. 1. \log (hématies agglutinées) en fonction de \log (hématies totales) ● à 15°C , ✕ à 25°C , ○ à 37°C

Il fallait, pour l'application de la statistique que nous voulions faire, s'assurer que l'effet de la température n'est pas dû à l'existence de groupes actifs différents. Plusieurs preuves en ont été données: en particulier, de l'agglutinine extraite par élution d'un agglutinat formé à 37° présente le même effet de température que le sérum lui-même.

2. Détermination de l'énergie de formation du complexe agglutinine — groupe agglutinogène

Nous avons donc admis⁷ que l'agglutination résulte de la fixation de molécules d'agglutinine A sur des groupes G tous pareils situés à la surface des hématies, et assez éloignés les uns des autres pour être sans interactions. Les hématies qui s'agglutinent sont celles qui ont fixé en moyenne un nombre minimum l de molécules d'agglutinine. Il suffit alors pour obtenir le taux d'agglutination en fonction de la concentration d'agglutinine (A) d'appliquer un raisonnement classique.

S'il existe à la surface de chaque hématie m groupes capables de réagir réversiblement avec l'agglutinine, il y aura une distribution des hématies HA portant un nombre n de molécules d'agglutinine, n variant de 0 (hématies nues) à m (hématies saturées).

Soit K la constante "intrinsèque" correspondant à l'équilibre:



entre l'agglutinine et les groupes agglutinogènes supposés réagir comme s'ils étaient des molécules séparées; $K(A)/1 + K(A)$ est la probabilité pour qu'un groupe individuel fixe une molécule d'agglutinine. En portant cette valeur dans la relation de Bernoulli, on trouve que le taux d'agglutination est:

$$\tau = [1 + K(A)]^{-m} \sum_{n=1}^{n=m} \frac{m!}{n!(m-n)!} [K(A)]^n$$

La variation du taux d'agglutination en fonction de la concentration d'agglutinine à une température donnée, peut être obtenue expérimentalement. On sait titrer l'agglu-

tinine en valeurs relatives $\alpha(A)$ d'après le nombre maximum d'hématies agglutinées à 4° C. On obtient la courbe $\tau = f[\alpha(A)]$ de la manière suivante: les valeurs de τ sont déterminées directement dans une première agglutination en comptant les hématies restées libres dans les mélanges constitués par une quantité fixe de sérum et des quantités croissantes d'hématies dans un volume constant. Les valeurs correspondantes de $\alpha(A)$ proviennent des titrages effectués par une série d'agglutinations pratiquées cette fois sur le liquide obtenu en centrifugeant chacun des mélanges ayant servi à la mesure de τ , après que l'équilibre d'agglutination a été atteint.

Les courbes de la Fig. 2 représentent les résultats obtenus pour des agglutinations d'un même sérum du groupe A, à 25° C et à 37° C.

On détermine à partir de ces courbes le rapport des valeurs de K à 25° C et à 37° C, en faisant comme seule hypothèse que le nombre l ne varie pas ou varie très peu avec la température. Ce rapport K_{25}/K_{37} est égal au rapport $(A)_{37}/(A)_{25}$ des concentrations relatives d'agglutinines pour un même taux d'agglutination. La valeur trouvée est 3.5 ± 0.2 , ce qui correspond à une enthalpie ΔH de -19000 calories.

Une détermination de ΔH qui n'implique pas d'hypothèse sur le mécanisme de l'agglutination proprement dite, consiste à porter en abscisses des grandeurs proportionnelles à $1/K(A)$ et en ordonnées des grandeurs proportionnelles à $1/A_f$, en appelant A_f l'agglutinine fixée divisée par la totalité des hématies. Cette quantité est

mesurée par différence entre l'agglutinine initiale et l'agglutinine restante. On doit obtenir une droite, si les groupes sont sans interaction:

$$\frac{I}{A_f} = \frac{I}{m} + \frac{I}{mK(A)} \quad (I)$$

Le rapport des pentes à 2 températures 37° C et 25° C est égal au rapport: K_{25}/K_{37} .

La Fig. 3 montre les points expérimentaux et les droites calculées⁸ d'après la méthode des moindres carrés, pour un même sérum (2519) à deux températures 37° C et 25° C, et pour un autre sérum (1028) à 37° C. Il s'agit de 2 séums de titre élevé (N_{\max}) est égal à 1254000 par μl pour le sérum 2519 et à 1925000 pour le sérum 1028).

Les pentes correspondantes pour le sérum 2519 sont: à 37° C, 1.851 avec une erreur standard $\sigma = 0.147$ et à 25° C, 0.573 avec une erreur standard donc 3.23 et l'enthalpie ΔH -18000 calories.

La concordance avec le résultat précédent -19000 calories est satisfaisante.

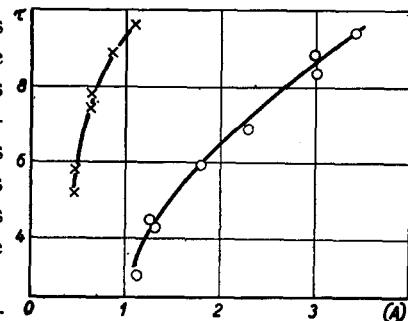


Fig. 2. Taux d'agglutination en fonction de la concentration d'agglutinine non fixée (en valeurs relatives) \times à 25° C, \circ à 37° C

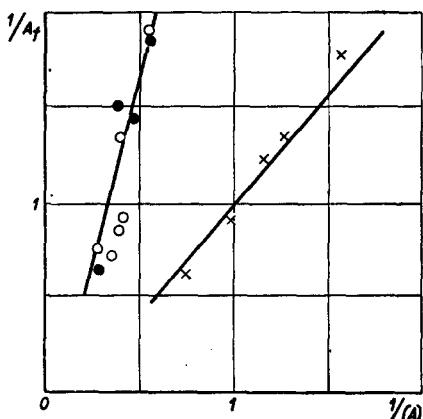


Fig. 3. Inverse de la quantité d'agglutinine fixée (en valeurs relatives) en fonction de l'inverse de la concentration d'agglutinine non fixée (en valeurs relatives). Sérum No. 2519, \times à 25° C, \bullet à 37° C; Sérum No. 1028, \circ à 37° C

standard $\sigma = 0.017$. Le rapport K_{25}/K_{37} ,

La concordance avec le résultat précédent -19000 calories est satisfaisante.

III. DISCUSSION

En ce qui concerne la nature des liaisons, on notera que 20 000 calories correspondent à la formation d'environ 4 liaisons hydrogène ou à une vingtaine d'attractions de Van der Waals (PAULING⁹). Ces valeurs sont raisonnables si l'on admet, par exemple, qu'un groupe agglutinogène renferme un polysaccharide.

On peut avoir une idée de la grandeur de la constante d'équilibre K. Cette constante "intrinsèque" caractérise l'équilibre entre l'agglutinine et les groupes agglutinogènes supposés indépendants. Elle est égale à une constante d'équilibre classique entre l'agglutinine et les hématies portant un nombre $\frac{m+1}{2}$ de groupes combinés, c'est-à-dire les hématies demi-saturées, parce que pour ces hématies l'effet statistique sur l'énergie libre est éliminé.

Nous avons utilisé les données de KABAT¹⁰ sur la concentration de l'isoagglutinine dans les sérums pour calculer la valeur de m à partir du rapport $(A)_o/(A)$ des concentrations d'agglutinine avant et après agglutination en présence d'un petit nombre d'hématies (environ $4 \cdot 10^3$ par μl). On trouve ainsi que m est de l'ordre de 10^6 , qui correspond d'ailleurs sensiblement au maximum de place disponible pour l'agglutinine à la surface d'une hématie. Cette valeur de m portée dans la relation (1) donne alors pour K la valeur $2 \cdot 10^8$ à 4°C , soit $1 \cdot 10^7$ à 37°C .

A cette dernière température la variation d'énergie libre par molécule-gramme d'agglutinine est $\Delta F = -10000$ calories et la variation d'entropie $\Delta S = -30$, environ 8 unités par liaison. Toutes ces valeurs apparaissent vraisemblables.

L'énergie libre ainsi trouvée est à comparer avec la valeur calculée selon les procédés ordinaires de la théorie statistique, par MORALES, BOTT'S ET HILL¹¹ pour l'énergie libre de combinaison d'une molécule d'antihémocyanine avec une molécule d'hémocyanine. Ces auteurs partent de la donnée calorimétrique de BOYD et collaborateurs. Ils tiennent seulement compte, pour obtenir la fonction de partition, des effets de translation et de rotation et supposent que les deux molécules ont même masse et même rayon, et que le moment d'inertie du complexe est celui d'une sphère équivalente. Leur résultat -11000 calories par groupe fixé est tout à fait voisin de celui que nous obtenons pour la combinaison de l'agglutinine avec un groupe agglutinogène d'une hématie. Mais dans le cas de l'hémocyanine, l'énergie totale étant de 40 000 calories, 8 liaisons de 5 000 calories, au lieu de 4, sont impliquées dans la formation du complexe; l'énergie libre par liaison est donc moitié de celle trouvée pour l'agglutinine.

La cohérence des résultats obtenus dans le cas de l'isohémagglutination présente un autre intérêt que celui de donner une base aux hypothèses possibles sur la nature des liaisons en jeu. Il sera utile d'introduire la mesure de ces grandeurs énergétiques dans la comparaison de sérums d'origines diverses. Après un examen plus approfondi des facteurs accessoires (force ionique, présence d'inhibiteurs), susceptibles de les faire varier pour une même agglutinine, il n'est pas exclu qu'il se dégage, d'une telle comparaison, des caractères de groupes intéressants, même à un point de vue strictement biologique.

RÉSUMÉ

On ne connaît pas de données rigoureuses sur l'énergie de liaison des enzymes à leur substrats. En ce qui concerne l'union des antigènes aux anticorps, il n'existe qu'une détermination calorimétrique de l'union de l'hémocyanine à l'antihémocyanine. L'étude de l'isohémagglutination a permis de calculer l'énergie de la liaison agglutinine-groupe agglutinogène et d'évaluer la constante d'équilibre correspondante, soit $1 \cdot 10^7$ à 37°C .

SUMMARY

No exact data are known about the energy of the bonds between enzymes and their substrates.

As to the attachment of antigens to antibodies only a calorimetric determination of the bond haemocyanin-antihemocyanin was known. The study of isohaemagglutination has permitted the calculation of the bond-energy of the complex agglutinin-agglutinogenic group and the estimation of the corresponding equilibrium constant, being $1 \cdot 10^7$ at 37°C .

ZUSAMMENFASSUNG

Man kennt keine genauen Angaben über die Bindungsenergie der Enzyme an ihre Substrate.

Was den Komplex Antigen-Antikörper anbelangt, so ist nur eine kalorimetrische Bestimmung der Bindung von Haemocyanin an Antihaemocyanin bekannt.

Die Untersuchung der Isohaemagglutination erlaubt die Energie der Verbindung Agglutinin-agglutinogene Gruppe zu berechnen und die entsprechende Gleichgewichtskonstante, $1 \cdot 10^7$ bei 37°C , anzugeben.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. B. S. HALDANE, *Enzymes*, Longmans, Green, and Co, London (1930) 182.
- ² A. E. STEARN, *Ergeb. Enzymforsch.*, VII (1938) 1.
- ³ M. DELBRÜCK, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, IX (1941) 122.
- ⁴ B. CHANCE, *J. Biol. Chem.*, 151 (1943) 553.
- ⁵ W. C. BOYD, J. B. CONN, D. C. GREGG ET G. B. KISTIAKOWSKY, *J. Biol. Chem.*, 139 (1941) 787.
- ⁶ S. FILITTI-WURMSER ET Y. JACQUOT-ARMAND, *Arch. sci. physiol.*, 1 (1947) 151.
- ⁷ S. FILITTI-WURMSER, Y. JACQUOT-ARMAND ET R. WURMSER, *Compt. rend. acad. sci.*, 226 (1948) 844.
- ⁸ S. FILITTI-WURMSER ET Y. JACQUOT-ARMAND, *travail non encore publié*.
- ⁹ L. PAULING, *The Specificity of Serological Reactions*; Landsteiner, Harvard University Press, 1945.
- ¹⁰ E. A. KABAT ET A. E. BEZER, *J. Exptl. Med.*, 82 (1945) 207.
- ¹¹ M. F. MORALES, J. BOTTS ET T. L. HILL, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 2339.

Reçu le 21 mars 1949