

## LE RÔLE DU CALCIUM DANS L'ACTIVITÉ ET LA STABILITÉ DE QUELQUES PROTÉINASES BACTÉRIENNES

par

LUIGI GORINI

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

C'est à BEUMER que l'on doit les premières observations concernant la nécessité du calcium pour l'activité d'une protéinase bactérienne: Cet auteur a observé<sup>1</sup> en effet qu'une bactérie isolée de l'air, appelée par lui *Coccus P*, cultivée sur sérum de cheval coagulé liquéfie facilement ce sérum dans les conditions normales alors qu'aucune liquéfaction n'a lieu si le calcium du sérum a été préalablement éliminé sous forme d'oxalate, et que<sup>2</sup>, dans ce dernier cas, il n'existe pratiquement pas d'enzyme protéolytique dans l'eau de lavage des cultures. D'autre part, BEUMER<sup>3</sup> a montré que la protéinase séparée par filtration des cultures de *Coccus P* et parfaitement capable de protéolyser le sérum de cheval coagulé, perd toute activité après introduction d'oxalate de sodium ou de citrate de sodium, soit dans la solution enzymatique soit dans le sérum avant coagulation de ce dernier. BEUMER conclut de ses recherches que non seulement la production de l'enzyme protéolytique par le *Coccus P*, mais aussi l'action même de cet enzyme sur le sérum coagulé, nécessitent la présence de calcium.

GORINI ET FROMAGEOT<sup>3</sup> ont d'autre part montré que le calcium était indispensable non seulement au fonctionnement, mais aussi à la stabilité de la protéinase de *Micrococcus lysodeikticus*, cet enzyme étant séparé de toute cellule bactérienne et agissant sur la gélatine et sur la caséine; ces mêmes auteurs<sup>4</sup> étudiant les conditions physiologiques influençant la présence de protéinase dans les cultures de *M. lysodeikticus*, ont souligné le rôle important que le calcium joue dans la stabilité, et par conséquent dans l'accumulation de l'enzyme dans les milieux de culture. Il ressort de leurs investigations, entre autres choses, que l'absence de protéinase dans des cultures bactériennes en absence de calcium, n'est probablement pas due, comme l'avaient pensé BEUMER<sup>3</sup> et, avant lui, MERRILL ET CLARK<sup>5</sup> et HAINES<sup>6</sup> dans le cas d'autres bactéries, à ce que les bactéries ne peuvent alors pas synthétiser l'enzyme, mais à ce que l'enzyme, instable, se détruit au fur et à mesure de sa production.

Afin de mettre en évidence son caractère général éventuel, et de pouvoir étudier son mécanisme, il était intéressant de rechercher si ce rôle du calcium se retrouvait dans les protéinases de plusieurs autres bactéries, et de comparer les résultats obtenus, avec ceux fournis par les protéinases de *Coccus P* et de *M. lysodeikticus* dans les mêmes conditions.

## PARTIE EXPERIMENTALE

## I. TECHNIQUES

## A. Bactéries

Les bactéries utilisées sont des espèces aérobies douées d'activité protéolytique en milieu neutre ou légèrement alcalin. Ces espèces sont les suivantes:

*Coccus P*, dont la souche, conservée à l'Institut Pasteur de Bruxelles, a été décrite par BEUMER<sup>1\*</sup>; elle présente beaucoup d'analogie avec *M. lysodeikticus* et, comme lui, se lyse facilement sous l'action du lysozyme; elle en diffère toutefois par l'instabilité de sa pigmentation et par son activité protéolytique beaucoup plus intense. *Bacillus megatherium* 899, *Bacillus mesentericus* V, *Proteus X 19* Syrie, *Pseudomonas pyocyanea* Bass., *Bacillus subtilis* "champignon", *Bacillus cereus* Caron, toutes souches provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Paris. *Micrococcus lysodeikticus*, souche déjà décrite dans un précédent travail<sup>4</sup>.

## B. Conditions de culture

Ces bactéries, sauf *B. megatherium* et *Proteus X 19*, sont cultivées dans un milieu constitué par: peptone 10 g, extrait de viande Liebig 25 g, glucose 8 g, eau de source 1 litre, pH ajusté à 7.3 par addition de soude. Ce milieu contient par litre à peu près 0.135 g de calcium ( $\sim M/300$ ) et 0.206 g de phosphore ( $\sim M/150$ ). *B. megatherium* et *Proteus X 19* sont cultivés dans un milieu qui est le même sauf qu'il ne contient pas de glucose. Dans tous les cas le milieu est réparti en couches minces dans des fioles d'Erlenmeyer; les cultures sont agitées pendant toute l'incubation qui dure 3 jours à 26°.

## C. Solutions enzymatiques

Les milieux de culture dont on a éliminé les cellules bactériennes par centrifugation, sont réajustés à pH 8 s'il y a lieu, puis additionnés de toluène et conservés à 0°. On obtient ainsi des solutions enzymatiques que l'on utilise soit telles quelles, soit après une dialyse de 8 heures à 6-10° contre un courant continu d'une solution tampon de borate diluée à  $M/1000$  ou de solution tampon, décrite ci-dessous, de morpholines diluée à  $M/1000$ , à pH 7.7.

## D. Mesure de l'activité protéolytique

Comme dans le travail précédent<sup>4</sup>, la protéolyse est étudiée vis à vis de la gélatine. Les essais sont faits en mélangeant: solution enzymatique 1 ml, réactifs éventuels dissous dans la solution tampon ou solution tampon seule 1 ml, solution de gélatine à 7% dans la solution tampon 5 ml; le volume total du milieu réactionnel est ainsi toujours de 7 ml. Sauf indication contraire, la solution tampon utilisée, de pH 8.0, est soit le mélange borate + HCl de CLARK ET LUBS<sup>7</sup>, soit le mélange morpholines + HCl décrit ci-dessous. Sauf indication contraire également, la température à laquelle se fait la protéolyse est de 37°.

La protéolyse est déterminée soit par viscosimétrie, soit par l'apparition d'azote aminé, dosé d'après VAN SLYKE-NEILL<sup>8</sup>. En ce qui concerne la viscosimétrie, les mesures sont toujours faites à 35°. Les variations relatives de la viscosité sont exprimées par  $F_t$

\* Nous sommes heureux de remercier ici le Dr J. BEUMER qui nous a aimablement envoyé cette souche.

défini antérieurement<sup>4</sup>. Il a semblé utile d'exprimer certains résultats par  $\varphi_t = \frac{F_t}{F_B}$ , où  $F_B$  est la limite vers laquelle tend la valeur de  $F_t$  pour une protéolyse totale; on a:

$$F_B = - \frac{(T_B - T_0) \cdot 100}{T_B}$$

expression dans laquelle  $T_B$  est le temps, en secondes, d'écoulement d'une solution étalon. Cette solution est constituée par 6 ml du milieu de culture filtré, et 1 ml de solution tampon; sa viscosité est pratiquement la même que celle d'un hydrolysât total de gélatine correspondant à la quantité de cette protéine utilisée dans les essais.

$\varphi_t$  permet d'avoir une idée du degré atteint par la protéolyse, après un temps donné, mais il est nécessaire de rappeler ici les remarques déjà faites<sup>4</sup> à propos de la signification de  $F_t$ : il n'y a pas de proportionnalité entre  $\varphi_t$  et l'activité enzymatique telle qu'elle se manifeste par l'apparition des groupes  $\text{NH}_2$ . Néanmoins il est possible de ramener les résultats obtenus par viscosimétrie à des valeurs à peu près proportionnelles à l'activité enzymatique c'est-à-dire à la quantité efficace d'enzyme présente; il suffit d'établir, pour chaque solution de protéinase, la courbe représentant  $F_t$  en fonction des quantités relatives d'enzyme. De telles courbes sont données par les Figures 1 et 2. Elles montrent que, toutes conditions égales d'ailleurs, les

activités protéolytiques des solutions de protéinases provenant de divers microorganismes, sont très différentes; aussi devra-t-on utiliser pour déterminer la quantité efficace d'enzyme d'après  $F_t$ , tantôt  $F_{10}$  (*Coccus P*, *Proteus X 19*), tantôt  $F_{tot}$ . (*B. subtilis*,

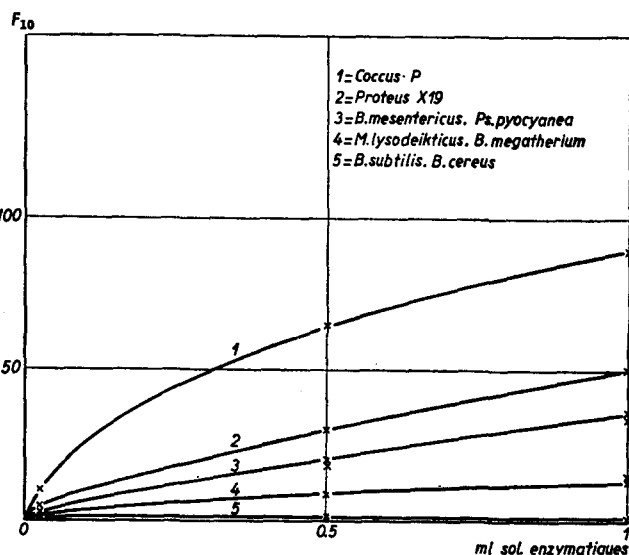


Fig. 1. Valeurs de  $F_{10}$  en fonction des quantités relatives de protéinases (solutions enzymatiques non dialysées)

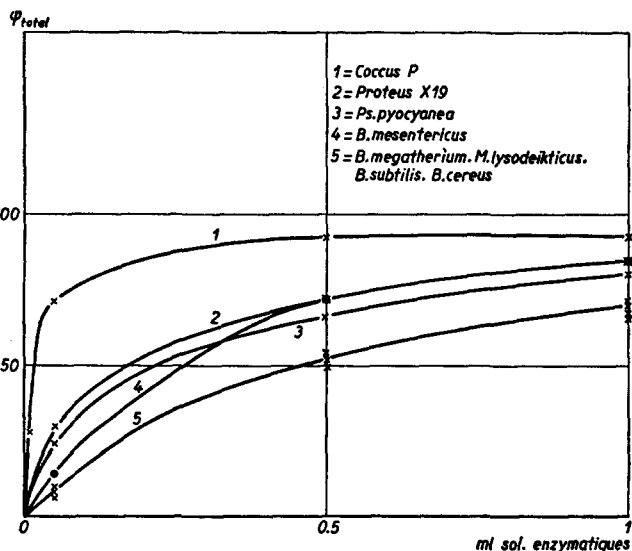


Fig. 2. Valeurs de  $\varphi_{tot}$  en fonction des quantités relatives de protéinases (solutions enzymatiques non dialysées)

*B. cereus*), tantôt même ces deux valeurs simultanément. Il convient de remarquer en effet que  $F_{10}$  représente une vitesse se confondant pratiquement avec la vitesse initiale de la protéolyse, sauf dans les cas d'une très grande activité protéolytique, alors que  $F_{100}$  indique le degré de protéolyse finalement atteint; le fait que ces valeurs n'atteignent pas toutes la même limite est dû à ce que les protéinases, plus ou moins stables selon les espèces bactériennes, perdent leur activité au cours même de leur fonctionnement.

## II. REMARQUES CONCERNANT LES TECHNIQUES

### A. Conditions de culture

1. *Température.* Un travail précédent<sup>4</sup> a montré que, dans le cas de *M. lysodeikticus*, la quantité de protéinase présente dans le milieu de culture était notablement plus élevée lorsque les bactéries étaient cultivées à 26°, que lorsqu'elles étaient cultivées à 37°. Une série d'expériences, dont les résultats sont présentés dans le Tableau I, montrent que ce phénomène se retrouve avec la plupart des microorganismes utilisés ici; en fait, il se manifeste avec toutes les bactéries capables de produire une protéinase en quantité appréciable.

TABLEAU I  
INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE D'INCUBATION SUR L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE  
DES MILIEUX DE CULTURE DE DIVERSES BACTÉRIES  
Valeurs de  $\varphi_{10}$  (milieu de culture filtré)

Bactéries	Températures d'incubation	
	37°	26°
<i>M. lysodeikticus</i>	0	20
<i>Coccus P</i>	57	87
<i>Proteus X 19</i>	10	50
<i>B. mesentericus</i>	19	21
<i>Ps. pyocyanea</i>	41	43
<i>B. megatherium</i>	7	13
<i>B. subtilis</i>	4	2
<i>B. cereus</i>	4	3

2. *Acidité du milieu.* L'étude de la genèse de la protéinase de *M. lysodeikticus* a indiqué également<sup>4</sup> que pendant l'incubation, le milieu ne doit pas s'acidifier: lorsque ce milieu atteint un pH égal ou inférieur à 6, il perd toute activité protéolytique. Nous avons constaté ici que, d'une façon assez générale, l'activité protéolytique des milieux de culture des bactéries utilisées diminue plus ou moins quand le pH de ces milieux tombe au-dessous de 7; c'est ainsi que, à pH 5, cette activité protéolytique, exprimée en % de l'activité moyenne du milieu de culture de chacune des bactéries en question, incubées dans les conditions optima, devient: *B. megatherium* 10, *Proteus X 19* 50, *Ps. pyocyanea*, *B. mesentericus* et *B. subtilis* 60 à 80. L'alcalinisation du milieu serait également nuisible. Aussi, la composition du milieu de culture est-elle établie de manière que le pH atteint à la fin de l'incubation soit compris entre 7.5 et 8.5. On a vu antérieurement<sup>4</sup> comment l'addition d'une petite quantité de glucose à un milieu de culture qui, en son absence, deviendrait trop alcalin, peut éviter cet inconvénient. Aussi, dans le présent travail, comme dans le travail précédent, a-t-on ajouté 0.8% de glucose au

milieu de culture, sauf dans le cas de celui destiné à la culture de *Proteus X 19* et de *B. megatherium*; le pH du milieu de culture de ces derniers organismes, en présence de cette quantité de glucose, tomberait en effet au-dessous de 7.

### B. Solutions tampons utilisées dans la mesure de l'action protéolytique

Le pH optimum des protéinases bactériennes étudiées ici est voisin de 8. L'étude du rôle éventuel joué par le calcium dans l'activité et la stabilité de cet enzyme, doit donc faire écarter tout système tampon susceptible de fixer le calcium d'une façon quelconque aux environs de ce pH; c'est ainsi que les solutions tampons à base de phosphates et de citrate doivent être écartées. En dehors des solutions tampons à base de borate et de celles à base de morpholines que nous avons mentionnées plus haut, nous avons constaté que les systèmes suivants pouvaient également être utilisés: cacodylate-NaOH<sup>9</sup>, acétate-véronal<sup>10</sup>, triéthanolamine-HCl<sup>11</sup>. Cependant, l'utilisation des solutions tampons à base de morpholines présente l'avantage de n'introduire aucun ion métallique ni aucun groupe susceptible de donner un complexe avec le calcium. Ces solutions à base de morpholines telles qu'elles ont été finalement mises au point ici, ont la composition et les propriétés indiquées dans le Tableau II.

TABLEAU II  
SOLUTIONS TAMPONS A BASE DE MORPHOLINES

10 ml de solution M/10 de méthylmorpholine (P.M. = 101) + 10 ml de solution M/10 d'éthylmorpholine (P.M. = 115) + g ml de solution de HCl N/10 + (80 - g) ml H<sub>2</sub>O.

pH mesurés à 20° à l'électrode de verre

g	pH	g	pH
2	8.50	12	7.40
4	8.15	14	7.20
6	7.90	16	7.00
8	7.75	18	6.70
10	7.60		

## III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### A. Quelques propriétés des protéinases telles qu'elles sont normalement obtenues

Avant d'étudier l'action propre du calcium sur les protéinases en question, il était nécessaire de déterminer quelques caractères des solutions enzymatiques telles qu'elles sont normalement obtenues, en présence de la quantité de calcium naturellement contenu dans les milieux de culture ( $\sim M/300$ ).

1. *pH optimum*. Les protéinases des bactéries étudiées, sauf *M. lysodeikticus*, ont leur optimum d'action entre pH 7 et pH 8, comme le montrent les chiffres du Tableau III. La protéinase de *M. lysodeikticus* a son pH optimum légèrement déplacé du côté alcalin, à 8.5 (Fig. 3). L'influence de la nature du tampon se manifeste de façon nette dans les courbes de la Fig. 3 qui représentent les variations d'activité de la protéinase de *M. lysodeikticus* en fonction du pH, en présence de solutions tampons de borate, de morpholines, ou de phosphates. On voit clairement que du côté acide, les résultats obtenus dans les trois tampons se rangent sur la même courbe, alors que du côté alcalin, en présence de

TABLEAU III

PH OPTIMUM D'ACTION SUR LA GÉLATINE DES PROTÉINASES DE DIVERSES BACTÉRIES  
Viscosimétrie; tampon morpholines

PH*	<i>Coccus P</i> $\varphi_{10}$	<i>Megatherium</i> $\varphi_{tot.}$	<i>Pyocyanea</i> $\varphi_{10}$	<i>Mesentericus</i> $\varphi_{tot.}$	<i>Proteus</i> $\varphi_{tot.}$	<i>Subtilis</i> $\varphi_{tot.}$	<i>Cereus</i> $\varphi_{tot.}$
5.7	—	76	22	54	29	21	12
6.6	57	76	43	54	57	—	—
7.2	80	79	53	56	70	29	34
7.7	83	79	49	—	70	—	37
8.0	86	66	30	44	70	24	31
8.5	74	—	—	40	66	21	—
9.5	—	8	18	25	21	18	6

\* pH mesuré à la fin des expériences. Les valeurs des pH n'ont guère varié au cours de l'action protéolytique, sauf dans le cas des solutions les plus acides: pH passé de 5.0 à 5.7, et des solutions les plus alcalines: pH passé de 10.0 à 9.5. Dans chacune de ces zones en effet, le pouvoir tampon des morpholines est très atténué.

phosphates, mais non en présence des autres tampons, l'activité tombe brusquement, le calcium nécessaire à l'activité enzymatique étant fixé par les phosphates.

2. *Stabilité au pH et à la température.* Le fait que l'activité protéolytique d'une culture, dont l'incubation se prolonge 3 jours, varie selon le pH atteint par le milieu et selon la température, conduit à supposer des différences dans les stabilités des protéinases séparées des cellules bactériennes. En ce qui concerne la protéinase de *M. lysodeikticus*, la Fig. 4 montre que cet enzyme est très labile à 37°; de toute façon, sa stabilité maximum se trouve à pH 7.7.

3. *Influence de la dialyse.* La dialyse des solutions enzymatiques brutes contre l'eau distillée fait changer le pH primitif de 8.0 à environ 5.5. Dans le cas d'un milieu tamponné, les chiffres du Tableau IV montrent une perte d'activité protéolytique plus ou moins grande suivant les bactéries étudiées. Mais si la dialyse s'effectue contre tampon borate, afin de maintenir le pH autour de 7.7, on n'observe pratiquement aucune inactivation.

#### B. Rôle du calcium dans l'activité des protéinases

1. *Inactivation des protéinases par divers réactifs du calcium.* L'un des moyens permettant de constater le rôle du calcium dans l'activité des protéinases en question est d'étudier l'influence éventuelle sur la réaction enzymatique de l'addition de réactifs capables de bloquer le calcium du milieu en donnant avec ce métal soit des sels insolubles, soit

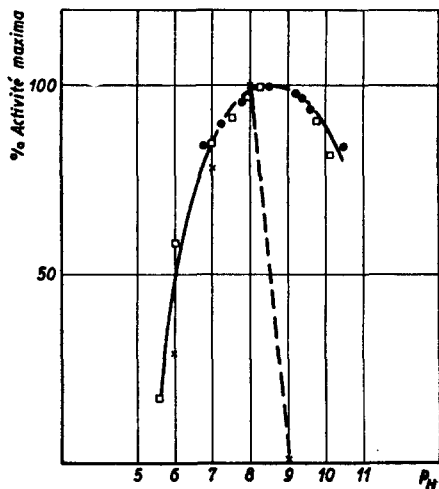


Fig. 3. pH optimum de la protéinase de *M. lysodeikticus* mesuré en présence de différents tampons:

- borate, mesures viscosimétriques,  $F_{tot}$
- morpholines, mesures viscosimétriques,  $F_{tot}$
- × phosphates, dosage groupes  $NH_2$  après 24 heures

TABLEAU IV

INFLUENCE DE LA DIALYSE SUR LES PROTÉINASES DE DIVERSES BACTÉRIES  
 $\gamma$  N aminé libéré après 2 heures à 26°

	Solutions enzymatiques I		Solutions enzymatiques II	
	Brutes	Dialysées contre eau distillée	Brutes	Dialysées contre tampon borate
<i>Coccus P</i>	1693	1662	1425	1330
<i>M. lysodeikticus</i>	350	147	280	266
<i>Ps. pyocyanea</i>	518	332	630	595
<i>B. cereus</i>	—	—	827	778

des complexes solubles ou non. Les réactifs utilisés ici sont: fluorure de sodium, citrate de sodium, oxalate de sodium, nitrilotriacétate de sodium (Complexone I ou C.I), éthylènediamino-tétracétate de sodium (Complexone II ou C.II)\*, hexaméthaphosphate de sodium (MP). Les expériences sont faites en présence de tampon borate de la façon suivante: 1 ml de la solution enzymatique est additionné de 1 ml de la solution ( $M/10$ ) du réactif à pH 8.0. La concentration du réactif en contact avec l'enzyme est donc de  $M/20$ . Le mélange est maintenu à 20° pendant 3 heures, 7 heures ou 24 heures. On fait parallèlement des essais témoins dans lesquels 1 ml de la solution enzymatique, additionné de 1 ml de solution tampon, est placé dans des conditions identiques. Après les temps qui viennent d'être indiqués, on introduit la solution de gélatine. Les degrés d'inactivation mesurés sont pratiquement les mêmes, pour une même solution enzymatique, et un même réactif, quels qu'aient été les temps de contact préalables avec ce réactif. On peut donc en prendre les moyennes; ce sont ces dernières qui sont données dans le Tableau V. La concentration des réactifs utilisés est dans tous les cas supérieure à celle qui est nécessaire pour obtenir le maximum d'inactivation. On doit remarquer ici que 1. La quantité de réactif nécessaire pour inactiver les solutions enzymatiques, dépend évidemment de la quantité de calcium contenu dans ces solutions et de l'origine des protéinases. Lorsqu'il s'agit de la protéinase de *M. lysodeikticus*, il suffit d'une quantité de citrate, d'oxalate ou de complexones à peine supérieure stoechiométriquement à la quantité de calcium présente dans le milieu, tandis que pour les protéinases de *Coccus P*, de *B. megatherium* ou de *B. mesentericus*, il faut pour obtenir le maximum d'inactivation, entre 2 et 3 molécules d'oxalate ou de complexone II, pour celles de *Ps. pyocyanea* et de *Proteus X 19*, 4 à 5 molécules de complexone II, et pour celles de *B. subtilis*, et de *B. cereus*, 5 à 6 molécules de complexone II par molécule de calcium. 2. L'inactivation obtenue dans ces conditions peut être totale ou partielle; dans ce dernier cas, l'inactivation se fixe à un palier qui ne peut pas être dépassé, même en présence d'une quantité de réactif 10 fois supérieure à celle qui est nécessaire pour atteindre ce palier. 3. L'inactivation des protéinases n'est jamais instantanée; le temps après lequel l'inactivation est maximum dépend de la quantité et de la nature du réactif, et de la température: d'après la vitesse de l'inactivation, on a le classement suivant:

Oxalate < Citrate < Complexone II

\* Nous sommes heureux de remercier ici la Maison Siegfried, Zöfingen (Suisse) qui nous a aimablement offert les échantillons de Complexone I et de Complexone II utilisés dans le présent travail.

TABLEAU V  
VALEURS DE  $\varphi$  OBTENUES SOUS L'ACTION DES DIVERSES PROTÉINASES  
EN PRÉSENCE DE QUELQUES RÉACTIFS DU CALCIUM

Origine des protéinases:		Témoin	Fluor.	Citr.	Oxal.	C I	C II	M P
<i>M. lysodeikticus</i>	$\varphi_{10}$	15	1	0	0	0	0	0
	$\varphi_{tot.}$	79	24	0	0	0	0	0
<i>B. megatherium</i>	$\varphi_{10}$	11	1	0	0	0	0	0
	$\varphi_{tot.}$	74	49	25	23	22	22	21
<i>Coccus P</i>	$\varphi_{10}$	83	9	6	4	3	0	0
	$\varphi_{tot.}$	93	60	47	37	42	38	37
<i>Proteus X 19</i>	$\varphi_{10}$	40	37	26	18	2	0	24
	$\varphi_{tot.}$	89	85	81	44	9	9	44
<i>Ps. pyocyanea</i>	$\varphi_{10}$	34	27	27	30	13	0	28
	$\varphi_{tot.}$	86	70	75	80	71	30	69
<i>B. mesentericus</i>	$\varphi_{10}$	37	10	9	9	11	2	2
	$\varphi_{tot.}$	89	85	80	82	77	65	74
<i>B. subtilis</i>	$\varphi_{10}$	4	4	4	3	2	1	1
	$\varphi_{tot.}$	71	69	66	66	61	61	59
<i>B. cereus</i>	$\varphi_{10}$	2	2	2	2	2	1	1
	$\varphi_{tot.}$	64	62	59	58	59	56	51

L'inactivation se faisant d'autant plus lentement que la température est plus basse. Dans le cas de *Coccus P* par exemple, l'inactivation maximum est atteinte sous l'action de la complexone II en 10 minutes à 20° et en 1 h à 0°; et sous l'action de l'oxalate en 30 minutes à 20° et en 4 h à 0°.

Dans le Tableau V, les réactifs étudiés sont classés dans l'ordre de leurs aptitudes croissantes à fixer le calcium. Il est facile de se rendre compte en effet que le citrate empêche la précipitation du calcium par le fluorure, que l'oxalate précipite le calcium de son complexe avec le citrate, mais ne le précipite pas de son complexe avec la complexone II; quant à la complexone I, elle se place juste avant la complexone II, puisque 5 molécules de complexone I n'empêchent pas complètement la précipitation d'une molécule de calcium par l'oxalate, alors que cette précipitation est complètement inhibée par 2 molécules de complexone II\*.

Les chiffres du Tableau V montrent que d'une façon générale, ces réactifs se rangent dans le même ordre si l'on considère leur aptitude à inactiver les protéinases. Seul le

\* L'étude quantitative des constantes de dissociation des complexes des réactifs en question avec le calcium, fera l'objet d'un travail ultérieur.



métaphosphate présente une action irrégulière: il se comporte généralement en inactivateur puissant, mais dans certains cas (*Ps. pyocyanea*, *Proteus X 19*) son action est faible. Peut-être l'irrégularité de ce comportement pourrait-elle s'expliquer par la présence éventuelle d'une métaphosphatase.

Les différentes protéinases sont rangées dans le Tableau V dans l'ordre de leur résistance croissante à l'inactivation. Elles présentent à ce point de vue de grandes différences de sensibilité: la protéinase de *M. lysodeikticus* étant la plus sensible, complètement inactivée par tous les réactifs sauf le fluorure, la protéinase de *B. cereus* étant la plus résistante puisque le métaphosphate lui-même n'exerce sur elle qu'une action assez faible.

Il convient de remarquer que toutes les protéinases, sauf celle de *M. lysodeikticus*, conservent une valeur de  $F_{tot.}$  qui ne s'annule jamais, même si la valeur de  $F_{10}$  tombe pratiquement à 0. Chaque enzyme garde donc une activité résiduelle correspondant au palier dont l'existence a été signalée plus haut. La signification de cette activité résiduelle sera discutée plus bas.

2. *Réactivation par le calcium des protéinases inactivées.* L'on peut toujours empêcher toute inactivation par addition de calcium à condition de l'ajouter à l'enzyme ou au réactif avant de réaliser leur mélange, ou immédiatement après. On peut aussi introduire le calcium dans la solution de gélatine, mais il faut alors ajouter celle-ci au mélange de l'enzyme et du réactif, dès que le mélange a été fait. Le calcium doit être ajouté au moins en les quantités stoechiométriques correspondant à chaque réactif. Au cours de ces additions, il faut veiller à maintenir le pH à 8.0. L'activité initiale de la protéinase demeure alors inchangée.

Si l'addition du calcium est faite un temps plus ou moins long après la mise en contact du réactif avec l'enzyme, l'activité initiale ne se retrouve plus qu'exceptionnellement. La fraction d'activité récupérée dépend de l'origine de la protéinase, de la température et du temps pendant lequel on a maintenu l'enzyme à l'état inactivé: le processus d'inactivation par élimination du calcium, réversible au début, devient par la suite plus ou moins rapidement irréversible. C'est ainsi que, dans le cas de la protéinase de *M. lysodeikticus*, une réactivation de 100% n'est possible que si l'inactivation par le citrate est réalisée à 0°, et si l'addition de calcium a lieu après un temps n'excédant pas 20 minutes; mais si l'addition du calcium à la protéinase inactivée à 0° n'a lieu qu'après 24 heures, la réactivation obtenue n'est plus que partielle. Les expériences dont les résultats sont donnés dans la Fig. 5 sont faites dans les conditions suivantes: à 5 ml de solution de protéinase, on ajoute 2.5 ml de solution de citrate de sodium  $M/10$  à pH 8.0. On maintient le tout à 0°. Après 20 minutes, on prélève deux échantillons de 1.5 ml; à l'un d'eux on ajoute 0.5 ml de solution tampon borate et 5 ml de solution de gélatine; on contrôlera ainsi le degré d'inactivation (V); à l'autre on ajoute 0.5 ml de  $CaCl_2$   $M/6$ , puis 5 ml de solution de gélatine; on mesurera ainsi le degré de réactivation (III). Après 24 heures on prélève

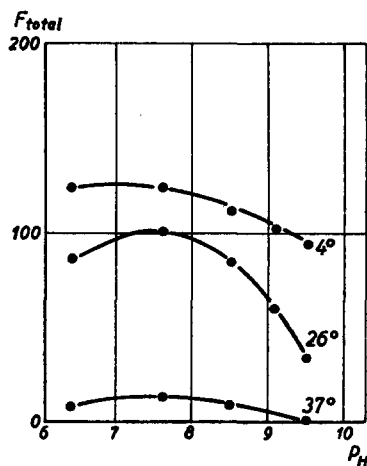


Fig. 4. Activité de la protéinase de *M. lysodeikticus* préalablement maintenue pendant 24 h à différentes températures et à différents pH; tampon borate

un nouvel échantillon de 1.5 ml auquel on ajoute 0.5 ml de  $\text{CaCl}_2$   $M/6$ , puis 5 ml de solution de gélatine (IV). D'autre part, on suit l'activité de la protéinase non traitée par le citrate, et utilisée soit telle quelle (1 ml de solution enzymatique + 1 ml de solution tampon borate) (I), soit après addition de  $\text{CaCl}_2$  (1 ml de solution enzymatique + 0.5 ml de solution de  $\text{CaCl}_2$   $M/6$  + 0.5 ml de solution de tampon borate) (II). Dans tous les cas l'activité protéolytique à 26° est déterminée sur 2 ml de milieu réactionnel, par des dosages des groupes  $\text{NH}_2$  libérés.

Les choses se passent de façon analogue dans le cas des protéinases d'autres bactéries, inactivées par la complexone II, les possibilités de réactivation totale par le calcium étant différentes selon l'origine des protéinases. Les chiffres du Tableau VI donnent le détail des expériences faites à ce sujet: on voit par exemple que dans le cas de *Coccus P*, il n'est plus possible de réactiver totalement l'enzyme si le temps de contact, à 0° ou à 20°, a été prolongé jusqu'à ce que l'on ait obtenu l'inactivation maximum.

TABLEAU VI

RÉACTIVATION PAR LE CALCIUM ( $M/200$ ) DES PROTÉINASES INACTIVÉES PAR LA COMPLEXONE II  $M/200$

Les conditions d'inactivation sont exprimées par deux chiffres: le premier représente le nombre de minutes pendant lesquelles l'enzyme a été maintenu à la température indiquée par le deuxième chiffre.

Origine et activité initiale des protéinases	Conditions d'inactivation	Enzyme			
		Inactivé		Réactivé	
		F <sub>10</sub>	F <sub>tot.</sub>	F <sub>10</sub>	F <sub>tot.</sub>
<i>Coccus P</i> F <sub>10</sub> = 180 F <sub>tot.</sub> = 310	5-0°	10	230	180	310
	30-0°	3	87	13	230
	15-20°	0	82	4	200
<i>B. megatherium</i> F <sub>10</sub> = 23 F <sub>tot.</sub> = 280	180-0°	3	75	10	250
	60-20°	3	75	7	230
<i>Proteus X 19</i> F <sub>10</sub> = 25 F <sub>tot.</sub> = 230	180-0°	0	25	25	230
	60-20°	0	25	5	230
<i>B. mesentericus</i> F <sub>10</sub> = 21 F <sub>tot.</sub> = 235	180-0°	5	135	12	180
	60-20°	5	135	11	180
<i>Ps. pyocyanea</i> F <sub>10</sub> = 67 F <sub>tot.</sub> = 270	5-0°	54	180	63	270
<i>B. subtilis</i> F <sub>10</sub> = 18 F <sub>tot.</sub> = 250	10-0°	2	170	17	250
<i>B. cereus</i> F <sub>10</sub> = 18 F <sub>tot.</sub> = 155	10-0°	4	140	11	150

A propos de l'utilisation de la complexone II comme réactif inactivateur, il convient de remarquer que, lorsque la complexone II a été introduite en quantité relativement élevée, l'addition ultérieure de chlorure de calcium provoque une acidification du milieu qui pourrait fausser l'interprétation des résultats. Pour éviter cette acidification, on opère de la façon suivante: après avoir déterminé dans un essai témoin la quantité de soude  $N/10$  que l'on doit ajouter pour que le  $pH$  du milieu soit de 8.0 après l'addition de chlorure de calcium, on divise cette quantité en fractions que l'on introduit alternativement avec des fractions de la solution de chlorure de calcium; on évite ainsi des modifications trop importantes du  $pH$  dans un sens ou dans l'autre.

3. *Spécificité du calcium dans la réactivation de la protéinase de M. lysodeikticus.* Il était intéressant de rechercher si le rôle du calcium qui vient d'être mis en évidence était spécifique de ce métal. Il convenait donc d'étudier à ce point de vue l'action éventuelle d'autres métaux divalents tels que Sr, Ba, Mg, Mn, Co, Fe, Zn. Une telle étude nécessite l'élimination du milieu de la combinaison calcium-réactif: en effet, si cette combinaison n'était pas éliminée, on pourrait toujours penser que l'introduction d'un métal autre que le calcium déplacerait le calcium de cette combinaison, et que la réactivation de l'enzyme, si réactivation il y a, est due au calcium ainsi libéré et non pas au métal introduit. Aussi avons-nous choisi ici comme réactif l'oxalate qui permet d'éliminer une quantité importante de calcium. Mais cette élimination n'est pas totale; il convenait donc de choisir un enzyme pour lequel la quantité de calcium subsistant alors est insuffisante pour que cet enzyme reste actif. Le Tableau V montre que la protéinase de *M. lysodeikticus* est dans ce cas; c'est elle qui a été utilisée ici.

Les expériences sont faites dans les conditions suivantes: à 20 ml de solution de protéinase, on ajoute 10 ml de solution d'oxalate de sodium  $M/10$  à  $pH$  8.0. On maintient le tout 2 heures à  $0^\circ$ , puis on élimine l'oxalate de calcium formé par centrifugation. On prélève un échantillon de 1.5 ml auquel on ajoute 0.5 ml de solution tampon borate et 5 ml de solution de gélatine; on contrôlera ainsi le degré d'inactivation. On prélève

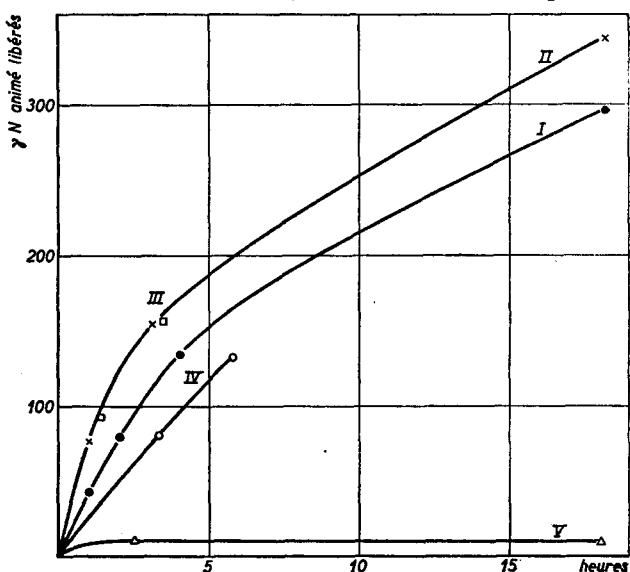


Fig. 5. Inactivation par le citrate puis réactivation par le calcium de la protéinase de *M. lysodeikticus*

dans la Fig. 6: ils sont particulièrement nets. La réactivation par le calcium est évidente. Il n'y a pratiquement aucune réactivation par Ba, Mg, Mn, Fe, Co et Zn. Seul en dehors du calcium, le strontium présente une activation; mais celle-ci quoiqu'indiscutable, est très légère; elle n'est que 15 à 20% de celle que l'on obtient avec le calcium.

### C. Rôle du calcium dans la stabilité des protéinases

Les courbes de la Fig. 4 montrent que la protéinase de *M. lysodeikticus* perd d'autant plus de son activité, qu'elle a été conservée à des températures plus élevées. On s'explique ainsi que la température à laquelle on maintient le mélange enzyme-gélatine, au cours des expériences sur l'activité de la protéinase, suffit à provoquer une inactivation de l'enzyme au cours même de ces expériences, lorsque celles-ci se prolongent plusieurs heures. C'est ainsi que dans certaines limites tout au moins, les valeurs de  $F_{tot.}$  obtenues après 18 heures sont d'autant plus élevées que la protéolyse a eu lieu à une température plus basse. Ce phénomène est encore plus marqué lorsque l'on étudie une solution d'enzyme préalablement dialysée (Tableaux VII et VIII). Cette inactivation par la tem-

TABLEAU VII

INFLUENCE DE LA DIALYSE SUR LA STABILITÉ DE LA PROTÉINASE DE *M. lysodeikticus*

Dialyse contre tampon morpholines  
Protéolyse à différentes températures en présence de tampon morpholines

Durée de la dialyse (heures)	$F_{tot.}$		
	Sans addition de calcium		En présence de calcium $M/70$
	20°	37°	37°
0	235	215	350
5	160	125	350
10	150	100	330
15	140	80	325
20	130	70	325

TABLEAU VIII

PROTECTION PAR LE CALCIUM DE LA PROTÉINASE DE *M. lysodeikticus* CONSERVÉE à 37°

Mesures de  $F_{tot.}$

Enzyme	Enzyme agissant à :				
	20°	37°			
		Préalablement maintenu à 37° pendant			
		0 h	3 h	20 h	50 h
Dialysé	170	105	56	0	0
Brut (Ca $M/300$ naturellement présent)	250	150	110	3	0
Brut ou dialysé (Ca $M/70$ ajouté)	278	278	278	230	105

pérature au cours de la protéolyse, disparaît complètement en présence de calcium, que l'enzyme ait été préalablement dialysé ou non. C'est ce qui ressort des chiffres des Tableaux VII et VIII, dans lesquels  $F_{tot.}$  atteint, en présence de Ca, une valeur qui reste pratiquement la même quelles que soient la température de la protéolyse et la durée de la dialyse.

Le Tableau VIII montre également que le calcium protège la protéinase contre l'inactivation qui se produit en l'absence de ce métal pendant l'action de l'enzyme sur la gélatine, mais aussi par simple maintien de la solution enzymatique à 37° par exemple.

Il était utile de rechercher si ce rôle de protection du calcium pouvait être rempli par un autre métal divalent. Les expériences faites à ce point de vue ont été réalisées de la façon suivante: 1 ml de solution enzymatique dialysée est additionné soit de 1 ml de solution tampon de borate, soit de 1 ml de solution  $M/10$  de  $CaCl_2$ ,  $SrCl_2$ ,  $BaCl_2$ ,  $SO_4Mn$  ou  $SO_4Mg$ , soit de 1 ml de solution de  $SO_4Mg$   $M$ , en tampon borate à pH 8.0 (malgré le pH légèrement alcalin, ces solutions ne précipitent pas). Le tout est soit additionné immédiatement de 5 ml de la solution de gélatine, soit abandonné à 37° pendant 24 heures avant d'être mis en contact avec la gélatine. De toute façon, l'action protéolytique se fait à 37°. Les résultats obtenus sont donnés par le Tableau IX, dans lequel on voit également les résultats d'une expérience témoin faite à 20°, avec une solution d'enzyme non dialysée.

TABLEAU IX

PROTECTION PAR DIFFÉRENTS MÉTAUX ( $M/20$ ) DE LA PROTÉINASE DE *M. lysodeikticus* CONSERVÉE À 37°

Mesures de  $F_{tot.}$

En présence de:	Enzyme brut (Ca $M/300$ ) agissant à 20°	Enzyme dialysé agissant à 37° préalablement maintenu à 37° pendant:	
		0 h	24 h
Tampon	250	108	0
Ca	278	278	240
Sr	260	230	25
Ba	—	104	0
Mg ( $M/20$ et $M/2$ )	240	108	0
Mn	—	105	0

Ces résultats montrent que en dehors du calcium, dont l'action protectrice est évidente, seul le strontium manifeste à ce point de vue une légère activité, qui de toute façon est beaucoup plus faible que celle du calcium. L'inefficacité totale du magnésium doit être soulignée ici: même à une concentration 10 fois plus forte que celle des autres métaux, son action est nulle.

La protection par le calcium de la protéinase de *M. lysodeikticus* contre son inactivation par la température, existe également dans le cas des autres protéinases sensibles à la température: protéinases de *B. megatherium* et de *B. mesentericus* (Tableau X). Dans le cas des protéinases qui se montrent stables vis à vis de la température, l'addition de calcium au milieu, dont on sait qu'il en contient déjà naturellement, n'a aucune influence.

TABLEAU X

STABILITÉ À 37° DES PROTÉINASES AUTRES QUE CELLE DE *M. lysodeikticus*

Origine		Maintenues à 37° pendant:			
		0 h	3 h	20 h	50 h
<i>B. megatherium</i>	$F_{10}$ $F_{tot.}$	11 165	7 140	3 120	— 100
<i>B. megatherium</i> + Ca M/70	$F_{10}$ $F_{tot.}$	20 210	20 210	20 210	— 200
<i>B. mesentericus</i>	$F_{10}$ $F_{tot.}$	12 170	12 170	7 145	— 135
<i>B. mesentericus</i> + Ca M/70	$F_{10}$ $F_{tot.}$	12 180	12 180	12 180	— 180
<i>Coccus P</i>	$F_{10}$ $F_{tot.}$	290 325	290 325	290 325	— —
<i>Proteus X 19</i>	$F_{10}$ $F_{tot.}$	140 312	130 312	131 300	— —
<i>Ps. pyocyanea</i>	$F_{10}$ $F_{tot.}$	100 300	87 300	83 260	— —
<i>B. subtilis</i>	$F_{10}$ $F_{tot.}$	14 249	14 249	14 249	— —
<i>B. cereus</i>	$F_{10}$ $F_{tot.}$	7 224	7 224	7 224	— —

#### D. Protection par d'autres métaux que le calcium des protéinases contre l'irréversibilité de l'inactivation

On a vu plus haut (p. 245) que l'inactivation des protéinases par les divers réactifs fixateurs de calcium devient plus ou moins rapidement irréversible. Il était utile de rechercher si d'autres métaux que le calcium, bien que ne semblant pas jouer de rôle dans l'activité de ces enzymes, pouvaient protéger les protéinases contre l'irréversibilité d'une telle inactivation. Les expériences, qui portent ici sur la protéinase de *M. lysodeikticus* inactivée par l'oxalate, sont faites de la façon suivante: 1 ml de solution enzymatique dialysée est additionné de 0.05 ml de solution M de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{Mn}$  ou  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , et de 0.5 ml de solution M/5 d'oxalate de sodium. Le tout est maintenu 24 heures à 0°. Au bout de ce temps, on ajoute soit 0.45 ml de solution tampon borate, soit 0.25 ml de solution tampon borate et 0.20 ml de solution M de  $\text{CaCl}_2$ . Dans tous les

cas, on ajoute ensuite 5 ml de la solution de gélatine. La protéolyse se fait à 37°; les valeurs de  $F_{tot.}$  obtenues sont présentées dans le Tableau XI. Il est intéressant de constater que le Mn et surtout le Mg, exercent ici une protection très nette, quoiqu'ils ne possèdent aucune influence dans l'activité proprement dite de l'enzyme.

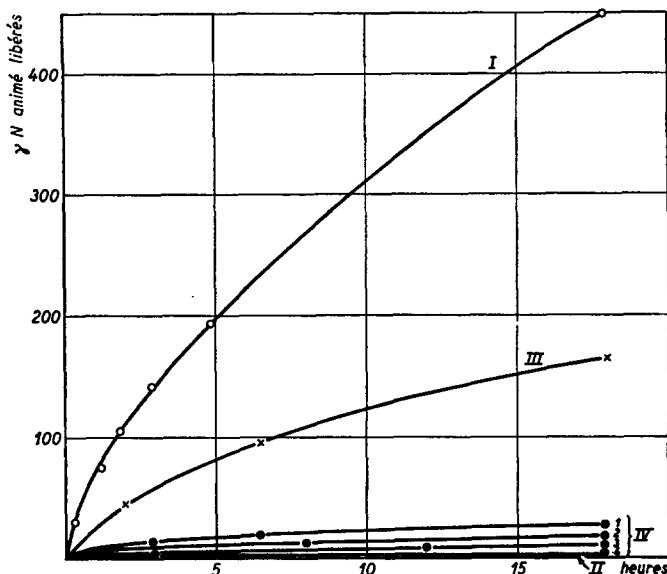


Fig. 6. Efficacité de divers métaux dans la réactivation de la protéinase de *M. lysodeikticus* inactivée par l'oxalate

- I. Protéinase brute  
 II. Protéinase traitée par l'oxalate  
 III. Protéinase traitée par l'oxalate puis réactivée par  $\text{CaCl}_2$   
 IV. Protéinase traitée par l'oxalate puis réactivée par divers métaux  
 1.  $\text{SrCl}_2$ ; 2.  $\text{BaCl}_2$ ; 3.  $\text{MgSO}_4$ ; 4.  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ .

TABLEAU XI

PROTECTION CONTRE L'IRRÉVERSIBILITÉ DE L'INACTIVATION

Protéinase de *M. lysodeikticus* inactivée par l'oxalate  
 $M/20$  en présence de métaux  $M/40$  pendant 24 heures  
 et à 0°  
 Réactivation par le calcium  $M/10$   
 Mesure de  $F_{tot.}$   
 $F_{tot.}$  de l'enzyme brut: 250

Métaux ajoutés avant l'inactivation	Enzyme inactivé	Enzyme réactivé
—	0	61
Ca	0	58
Sr	0	64
Ba	0	64
Mn	0	150
Mg	0	200

## DISCUSSION

L'ensemble des résultats précédents montre que le calcium joue un rôle indispensable dans l'activité et dans la stabilité des protéinases bactériennes. Tout conduit à envisager que le calcium est un constituant de ces enzymes eux-mêmes: conservation de l'activité enzymatique après dialyse, même prolongée, lorsque cette dialyse est faite à pH 7.7; différence dans les actions inactivantes des divers réactifs du calcium, l'ordre dans lequel ces réactifs inhibent les protéinases étant le même que celui de leur affinité pour le calcium; enfin et surtout, instabilité des protéinases constituant les enzymes en question, lorsque ces protéines sont privées de calcium. Ce sont donc les complexes protéine-calcium qui possèdent une activité protéolytique et qui constituent les enzymes proprement dits. Dans ces complexes, la liaison entre protéine et calcium est plus ou moins labile: dans le cas des protéinases de *M. lysodeikticus* et de *B. megatherium* par exemple, cette labilité est telle qu'il faut ajouter du calcium aux solutions de ces enzymes pour obtenir le maximum d'activité protéolytique, quoiqu'il y ait naturellement déjà dans ces solutions une quantité de calcium non négligeable. Ces protéinases sont d'autre part très sensibles à la température, à la dialyse en milieu légèrement acide, aux réactifs capables de bloquer le calcium, même à ceux qui, comme le fluorure et l'oxalate, ne possèdent qu'une action relativement faible à ce point de vue. Dans le cas de *B. subtilis* et de *B. cereus*, cette liaison est au contraire très forte; l'addition de calcium n'a aucune action et l'emploi des réactifs fixateurs de calcium les plus énergiques ne permet pas d'obtenir l'inactivation complète de ces enzymes. Entre ces deux types extrêmes, on rencontre tous les degrés intermédiaires. Il apparaît ainsi que ces protéinases, quoique appartenant toutes à un même genre, diffèrent légèrement les unes des autres.

Le rôle du calcium dans la stabilité des protéinases se manifeste essentiellement par le fait que l'inactivation de ces enzymes, par élimination du calcium, devient rapidement plus ou moins irréversible. L'instabilité, après élimination du calcium, des protéines constituant les protéinases de différentes origines, n'est d'ailleurs pas la même pour toutes. Cette instabilité explique les résultats obtenus par MERRILL ET CLARK<sup>5</sup> et par HAINES<sup>6</sup>; ces auteurs ont constaté qu'il existe des protéinases dans les milieux de culture de *B. proteus*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Ps. fluorescens*, *Ps. pyocyanea*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter* sp., lorsque ces bactéries ont été cultivées en présence de calcium, alors que ces milieux ne renferment aucune protéinase si les bactéries se sont développées en l'absence de calcium: dans ce dernier cas, l'addition de calcium aux milieux filtrés ne fait apparaître aucune activité protéolytique. Ils en ont conclu que le calcium était indispensable à la synthèse des protéinases par les bactéries, mais non à l'activité de ces enzymes. Les résultats du présent travail, confirmant ceux déjà obtenus par GORINI ET FROMAGEOT<sup>3</sup>, montrent au contraire que les protéinases, synthétisées sous une forme quelconque à l'intérieur des cellules, ne peuvent subsister à l'extérieur de ces cellules et s'accumuler dans le milieu de culture que sous la forme active et stable de complexe protéine-calcium. Quand le calcium fait défaut, la partie protéique de ces enzymes se détruit rapidement. On comprend ainsi qu'après une incubation de plusieurs jours à 26°, toute réactivation des protéines en question soit devenue impossible. Une réactivation ne pourrait avoir de chance de succès, dans le cas de cultures en l'absence de calcium, qu'en opérant sur des protéinases extraites de cellules bactériennes prélevées en pleine phase de croissance logarithmique, cette extraction étant faite par une destruction suffisamment rapide des cellules.



TABLEAU XII

RÉSISTANCE COMPARÉE DES DIVERSES PROTÉINASES A L'INACTIVATION

A = Activité résiduelle en % de l'activité initiale  
 + Inact. = Valeurs d'inactivation maximum obtenue

Origine des protéinases	$\varphi_{10}$			$\varphi_{tot.}$			
	telle quelle	+ calcium	+ inact.	telle quelle	+ calcium	+ inact.	A %
<i>M. lysodeikticus</i>	15	19	0	79	90	0	0
<i>B. megatherium</i>	11	13	0	74	82	16	1
<i>Coccus P</i>	83	90	3	93	95	51	1
<i>Proteus X 19</i>	40	40	0	89	89	7	1
<i>Ps. pyocyanea</i>	34	38	0	86	91	19	5
<i>B. mesentericus</i>	37	37	2	89	89	64	30
<i>B. subtilis</i>	4	4	1	71	71	53	50
<i>B. cereus</i>	2	2	1	64	64	44	50

Ces considérations sont illustrées par les chiffres du Tableau XII; ces chiffres donnent les valeurs de  $\varphi_{10}$  et de  $\varphi_{tot.}$  pour chaque protéinase étudiée; soit telle quelle, soit en présence d'un excès de calcium, soit après inactivation la plus grande possible; en outre ils indiquent la proportion d'activité qui subsiste dans ce dernier cas. La conservation d'une activité non négligeable, même en présence d'un excès de réactifs fixant énergiquement le calcium, comme la complexone II et le métaphosphate, fait que dans certains cas extrêmes (*B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. cereus*), on doit admettre ou bien qu'une partie du calcium de l'enzyme n'est plus ni dissociable ni accessible aux réactifs utilisés ici, ou bien qu'il s'agit d'un autre type de protéinases.

En ce qui concerne la spécificité du rôle joué par le calcium, il apparaît que l'action de ce métal vis à vis des protéinases est beaucoup plus marqué que celle de n'importe lequel des autres métaux étudiés ici. La légère action réactivatrice mais non protectrice du strontium d'une part et l'action protectrice mais non activatrice du manganèse et surtout du magnésium d'autre part vis à vis de la protéinase de *M. lysodeikticus* inactivée par l'oxalate et maintenue à 0°, présentent un intérêt particulier: ces actions différentes conduisent en effet à préciser le double rôle du calcium comme constituant des protéinases: le calcium joue d'une part un rôle dans l'activité même de ces enzymes que l'on doit désormais considérer comme des métallo-protéines; et, suivant l'hypothèse de SMITH<sup>9</sup>, on peut penser que, comme pour d'autres métallo-protéines, le calcium prend part à l'union entre les protéinases et leurs substrats au moment de la protéolyse. Dans ce rôle, le calcium peut être remplacé, pour une petite part, par le strontium et seulement par lui; mais le complexe protéine-strontium ainsi formé ne possède qu'une toute petite fraction de l'activité du complexe calcique correspondant. D'autre part, le calcium, faisant partie de la molécule de protéinase, assure la stabilité de sa structure. Dans ce rôle le calcium peut être remplacé par le magnésium. Mais alors, le complexe protéine-magnesium ainsi formé, s'il conserve à la protéine sa structure fondamentale, n'a plus aucune activité protéolytique.

## RÉSUMÉ

La production de protéinases par toute une série de bactéries (*M. lysodeikticus*, *B. megatherium*, *Coccus P.*, *Proteus sp.*, *Ps. pyocyanea*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* et *B. cereus*), cultivées en aérobiose et à pH compris entre 7 et 8, est d'autant plus forte que ces cultures se font à température plus basse, ici 26°. Le pH optimum de ces protéinases est compris entre 7 et 8.

L'activité de ces protéinases, séparées de toute cellule bactérienne, est inhibée par différents réactifs du calcium: fluorure, citrate, oxalate, nitrilotriacétate (Complexone I), éthylènediamino-tétracétate (Complexone II), hexamétophosphate de sodium. L'inactivation des diverses protéinases par ces réactifs n'est pas instantanée, et se fait d'autant plus lentement que la température est plus basse. Les diverses protéinases présentent de grandes différences de sensibilité, celle de *M. lysodeikticus* étant la plus sensible, complètement inactivée par tous les réactifs sauf le fluorure, celle de *B. cereus* étant la plus résistante puisque même la complexone II et le métaphosphate n'exercent sur elle qu'une action assez faible.

L'inactivation des protéinases par les réactifs précédents peut être complètement empêchée par addition du calcium à condition que celui-ci soit ajouté sitôt fait le mélange de l'enzyme aux réactifs. Si le calcium est ajouté un temps plus ou moins long après ce mélange, l'activité initiale ne se retrouve plus qu'exceptionnellement: le processus d'inactivation par élimination du calcium, réversible au début, devient par la suite plus ou moins rapidement irréversible. D'autre part, le calcium protège les protéinases contre leur inactivation par la température.

Le calcium joue ainsi un rôle fondamental d'une part dans l'activité et d'autre part dans la stabilité des protéinases bactériennes: c'est un constituant de ces enzymes; ceux-ci sont donc des métalloprotéines dans lesquelles, selon leur origine, la liaison entre protéines et calcium est plus ou moins labile. Dans son rôle de substance active vis à vis de la protéolyse, le calcium ne peut être remplacé que par le strontium et seulement pour une petite part; dans son rôle de constituant de la molécule de protéinase, assurant la stabilité de la structure de l'enzyme, le calcium peut être remplacé en partie par le magnésium; mais le complexe protéine-magnésium ainsi formé, s'il conserve à la protéine sa structure fondamentale, ne possède aucune activité protéolytique.

Au cours des recherches précédentes, a été mise au point et utilisée une nouvelle solution tampon, à base de méthyl- et d'éthylmorpholine, utilisable entre pH 6.7 et pH 8.5, et ne contenant ni ion métallique ni substance capable de complexer le calcium.

## SUMMARY

The production of proteinases by a whole series of bacteria (*M. lysodeikticus*, *B. megatherium*, *Coccus P.*, *Proteus sp.*, *Ps. pyocyanea*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, and *B. cereus*), grown aerobically and at pH 7-8, is the more, the lower the temperature; this work was carried out at 26°. The optimum pH of these proteinases is between 7 and 8.

The activity of these proteinases, when separated from bacterial cells, is inhibited by various reagents for calcium: fluoride, citrate, oxalate, nitrilotriacetate (Complexon I), ethylenediamino-tetraacetate (Complexon II), and sodium hexametaphosphate. The inactivation of the various proteinases is not immediate and takes place more slowly as the temperature is lower. The sensitivity of these enzymes varies considerably. That from *M. lysodeikticus* is the most sensitive and is completely inactivated by all the reagents except the fluoride. That from *B. cereus* is the most resistant, even complexon II and the metaphosphate having only a weak action.

The inactivation of the proteinases by the above-mentioned compounds can be completely prevented by addition of calcium, provided this is done immediately after addition of the reagent. If the calcium is added later, the original activity is regained only in exceptional cases. The inactivation by elimination of calcium is reversible in the beginning, but subsequently becomes more or less rapidly irreversible. On the other hand, the calcium protects the proteinases against inactivation by heat.

The calcium thus plays a fundamental part in these bacterial proteinases, not only in their activation but also in their stability: it is a constituent of these enzymes, which must therefore be considered as metalloproteins in which, according to their origin, the bond between the protein and the calcium is more or less labile. The calcium in its rôle as the active substance as regards proteolysis can be replaced only by strontium and only to a slight extent. As a constituent of the proteinase-molecule, assuring the stability of the enzyme structure, calcium can be substituted partially by magnesium. However, the protein-magnesium complex so formed, although keeping the fundamental structure, has no proteolytic activity.

In the course of the above-mentioned research, a new buffer solution, containing methyl- and ethylmorpholine, has been tried out. It can be used between pH 6.7 and 8.5 and includes neither metallic ions nor substances capable of forming complexes with calcium.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Bildung von Proteinasen durch eine ganze Reihe von Bakterien (*M. lysodeikticus*, *B. megatherium*, *Coccus P.*, *Proteus sp.*, *Ps. pyocyanea*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* und *B. cereus*) unter aeroben Bedingungen und bei pH 7–8 ist um so stärker, je niedriger die Temperatur gehalten wird. In diesen Versuchen wurde bei 26° gearbeitet. Das pH-Optimum dieser Proteinasen beträgt 7–8.

Die Aktivität dieser Proteinasen in Abwesenheit von Bakterienzellen wird durch verschiedene Reagentien die Ca ausfällen oder komplex binden wie: Fluorid, Citrat, Oxalat, Nitrilotriacetat (Komplexon I), Äthylendiaminotetraacetat (Komplexon II), Hexametaphosphat gehemmt. Die Inaktivierung der verschiedenen Proteinase geschieht nicht augenblicklich sondern um so langsamer, je tiefer die Temperatur ist. Die Empfindlichkeit der Proteinase ist sehr verschieden: am empfindlichsten ist die Proteinase von *M. lysodeikticus*, die durch alle Reagentien mit Ausnahme von Fluorid vollständig inaktiviert wird, am widerstandsfähigsten ist die Proteinase von *B. cereus*, auf welche sogar Komplexon II und Metaphosphat nur eine schwache Wirkung ausüben.

Die Inaktivierung der Proteinase durch die oben erwähnten Reagentien kann durch Zugabe von Calcium vollkommen verhindert werden, wenn dieses sofort nach Zugabe des Reagens beigefügt wird. Wird das Calcium später zugegeben, so wird die ursprüngliche Aktivität nur in Ausnahmefällen wiederhergestellt. Die Inaktivierung durch Ausscheidung des Calciums ist anfangs reversibel, wird aber dann früher oder später irreversibel. Andererseits schützt das Calcium die Proteinase gegen Inaktivierung durch Wärme.

Das Calcium spielt also sowohl bei der Aktivierung wie für die Stabilität der Bakterienproteinasen eine grundlegende Rolle: es ist ein Bestandteil dieser Enzyme; diese müssen daher als Metallo-Proteine angesehen werden, in denen je nach ihrem Ursprung, die Bindung zwischen Proteinen und Calcium mehr oder weniger labil ist. Als aktive Substanz der Proteolyse kann das Calcium nur durch Strontium und zwar nur zu einem kleinen Teil ersetzt werden; als Bestandteil des Proteinase-Moleküles (in diesem Fall übernimmt das Calcium die Funktion die Stabilität der Enzymstruktur zu sichern) kann das Calcium teilweise durch Magnesium ersetzt werden. Der so gebildete Protein-Magnesium-Komplex schützt zwar die Grundstruktur des Proteins, besitzt aber keinerlei proteolytische Aktivität.

Im Laufe der oben beschriebenen Untersuchungen wurde eine neue Pufferlösung angewendet, die Methyl- und Äthylmorpholin enthält. Die Pufferlösung hat sich zwischen pH 6.7 und pH 8.5 gut bewährt; sie enthält weder Metallionen noch andere Substanzen die mit Calcium eine Komplexverbindung bilden können.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. BEUMER, *Acta biol. belg.*, 2 (1941) 273.
- <sup>2</sup> J. BEUMER, *Acta biol. belg.*, 2 (1941) 276.
- <sup>3</sup> L. GORINI ET C. FROMAGEOT, *Compt. rend.*, 229 (1949) 559.
- <sup>4</sup> L. GORINI ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 524.
- <sup>5</sup> A. T. MERRILL ET W. M. CLARK, *J. Bact.*, 15 (1928) 267.
- <sup>6</sup> R. B. HAINES, *Biochem. J.*, 25 (1931) 1851; 26 (1932) 323; 27 (1933) 466.
- <sup>7</sup> W. M. CLARK ET H. A. LUBS, *J. Biol. Chem.*, 25 (1916) 479.
- <sup>8</sup> D. VAN SLYKE ET J. NEILL, *J. Biol. Chem.*, 61 (1924) 523 et D. VAN SLYKE, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 425.
- <sup>9</sup> E. L. SMITH, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 35 (1949) 80.

Reçu le 28 juin 1950