

PURIFICATION ET
PROPRIÉTÉS DE LA β -GALACTOSIDASE (LACTASE)
D'ESCHERICHIA COLI^{*}

par

MELVIN COHN** ET JACQUES MONOD

Institut Pasteur, Paris (France)

Nous présentons dans ce mémoire quelques observations sur les propriétés chimiques d'une préparation de β -galactosidase obtenue à partir de la souche "ML" d'*E. coli mutabile*. L'isolement, la purification partielle et certaines propriétés de cet enzyme désigné alors sous le nom de "lactase" ont été décrits ou mentionnés dans des publications antérieures^{14, 15, 18}. On verra pourquoi il nous a paru nécessaire d'abandonner cette désignation. C'est en raison de ses propriétés adaptatives que nous nous sommes attachés à l'étude de cet enzyme, mais nous n'abordons pas ici la question du déterminisme adaptatif ou génétique de sa formation. Les données réunies dans ce mémoire concernent uniquement la préparation d'une galactosidase purifiée, les propriétés chimiques de cette préparation (hydrolyse du lactose et de l'*o*-nitrophényl- β -D-galactoside, effets des ions et du pH , inactivation thermique), ses propriétés antigéniques et certaines de ses propriétés physiques (électrophorèse).

Ces observations concernent surtout l'hydrolyse du *lactose*, alors qu'il eut été souhaitable de comparer, dans chaque type d'expérience, l'activité en présence de plusieurs β -galactosides différents. Quelques essais comparatifs ont pu cependant être faits avec le lactose et l'*o*-nitrophényl- β -D-galactoside (niphégal). Toujours est-il que les observations faites révèlent quelques propriétés remarquables de cet enzyme, en particulier les effets complexes des ions alcalins. On voudra bien considérer que ce travail apporte à l'étude de cet enzyme une contribution partielle dont nous espérons que les lacunes seront peu à peu comblées.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1. Réactifs

Les sels minéraux étaient des produits Merck, type "C.P.". La triéthanolamine et l'acide cacodylique étaient de marque "Rhône Poulenc". Le lactose était un produit Pfanzstiehl "C.P.". L'eau était distillée sur pyrex après déminéralisation sur colonnes

* Ce travail a bénéficié d'une subvention du "National Institute of Health", Public Health Service, Bethesda, Maryland, Etats-Unis.

** Fellow du "National Research Council" des Etats Unis (Fondation Merck).

de résine. Les tampons au phosphate et au cacodylate de triéthanolamine étaient préparés par neutralisation de l'acide jusqu'au pH voulu. Les concentrations sont exprimées en molarité de l'anion. L'*o*-nitrophényl- β -D-galactoside²² — que désormais nous appellerons en abrégé "niphégal" — nous a été obligeamment envoyé par Mr S. SPIEGELMAN. La notatine était préparée par la méthode de COULTHARD *et al*⁵. La souche de *Penicillium* productrice de notatine nous a été envoyée par Mr SHORT de la "Boots pure Drugs Co".

2. Mesures d'activité

L'hydrolyse du lactose a été suivie par titrage du glucose à l'aide de la glucose-oxydase de *P. notatum* (alias *notatine*). On sait que cet enzyme constitue un réactif spécifique du glucose⁸ et permet de le doser avec une excellente précision, en présence d'autres glucides^{9, 17}, par détermination manométrique de l'oxygène consommé.

Deux techniques ont été, suivant les circonstances, employées pour les mesures d'activité.

a. *Technique à deux temps*. L'enzyme est ajouté, à dilution convenable, à une solution contenant du lactose *M/10*, ainsi que le tampon et les sels appropriés, variables suivant les expériences. Le tube à essai contenant le mélange est maintenu à 28° C pendant un temps donné (n'excédant pas, en principe, 20 minutes) après quoi il est plongé dans l'eau bouillante pendant 3 minutes, puis refroidi. Les temps et les concentrations d'enzyme sont calculés approximativement de façon que moins de 10% du lactose soit hydrolysé au cours de l'essai. Le mélange est additionné de nitrate de sodium (concentration finale *M/50*) dont le rôle est d'inhiber toute activité peroxydasique ou catalasique. Il est additionné enfin de tampon à l'acétate de sodium (concentration finale *M/10*) à pH 5.3, optimum pour l'activité de la notatine, et porté à volume constant. Une fraction donnée de ce volume (1 à 2 ml) est portée dans une fiole de WARBURG dont le diverticule contient une solution de notatine. On détermine ainsi la quantité d' O_2 correspondant à l'oxydation du glucose libre. Une *molécule* d' O_2 équivaut, dans ce cas, à une molécule de glucose, soit à l'hydrolyse d'une molécule de lactose. La notatine oxyde également très lentement le galactose, mais son affinité pour ce glucide est faible de sorte que cette réaction parasite est pratiquement inopérante dans ces conditions, où la concentration d'hexose libéré n'excède guère 0.005 *M* environ. L'activité mesurée par cette méthode est indépendante de la dilution de la β -galactosidase. Les résultats sont d'une précision et d'une fidélité tout à fait remarquables (voir par exemple les chiffres donnés par le Tableau III première ligne).

b. *Technique à un temps*. L'enzyme, à dilution convenable, est introduit dans le diverticule d'une fiole de WARBURG. Le compartiment principal de la fiole contient une solution *M/10* de lactose, dans un tampon approprié, variable suivant les expériences. Cette solution est additionnée de notatine et de catalase. Si l'on fait en sorte que la notatine et la catalase soient en *grand excès* par rapport à la galactosidase, la vitesse de consommation de l'oxygène est proportionnelle à la concentration de celle-ci. En pratique, l'absorption d'oxygène ne doit pas dépasser 400 μ l/h par fiole et les quantités de notatine et de catalase employées dans chaque fiole correspondent au moins à dix fois cette activité. Dans ces conditions (présence de catalase) un *atome* d'oxygène consommé correspond à une *molécule* de lactose hydrolysé. La réaction est d'ordre zéro, comme par la première technique, mais les résultats sont moins précis ($\pm 5\%$) tout en restant satisfaisants.

L'hydrolyse enzymatique de l'*o*-nitrophénol- β -D-galactoside (niphégal) a été suivie par mesure de la densité optique à 420 m μ dans le spectrophotomètre BECKMAN. Une solution de niphégal M/600 était employée, à une température malheureusement assez mal contrôlée (environ 27° C). Cette solution était additionnée d'une dilution convenable d'enzyme. L'accroissement d'absorption résultant de la libération de l'*o*-nitrophénol était mesuré de minute en minute pendant 5 minutes. Un étalonnage préalable avait été fait à l'aide d'une solution titrée d'*o*-nitrophénol dans des conditions identiques. La réaction est encore d'ordre zéro, mais la précision des résultats souffre du mauvais réglage de la température. Les écarts atteignent 8 à 10%.

Toutes les activités sont exprimées en μM de substrat hydrolysé, par heure et par mg d'azote de la préparation.

L'azote protéique était déterminé par la méthode de KJELDAHL après précipitation et lavage par l'acide trichloracétique à 5%.

3. Souche, Milieux

Nous avons employé la forme lactose-positive et maltose-positive de la souche "ML" d'*E. coli*¹⁶. Le milieu était le suivant:

PO₄KH₂ 27.2 g; SO₄(NH₄)₂ 4.0 g; SO₄Mg.7H₂O 0.4 g; Cl₂Ca 0.01 g; SO₄Fe.7H₂O 0.0005 g; Lactose (stérilisé à part par filtration) 8.0 g; NaOH q.s. p. pH 7.00; Eau distillée q.s. p. 1.000.

Le milieu est réparti par 250 ml dans des fioles coniques de 2 l. On ensemence très largement et on agite à 34° C. La culture est arrêtée par addition de glace quand la densité bactérienne atteint 1.5 mg de poids sec par ml environ.

II. RÉSULTATS

1. Extraction et purification de la lactase

Les opérations d'extraction et de purification sont résumées par le Tableau I qui indique les résultats obtenus à chaque stade. La technique d'extraction par traitement au toluène dans l'eau distillée a été adoptée après divers essais effectués en présence d'électrolytes, qui se montrèrent peu favorables à l'extraction par le toluène. Après la première centrifugation (élimination des corps microbiens) le liquide surnageant contenait de 40 à 70% de l'activité initiale totale. Nous avons obtenu également de bonnes extractions par une solution saturée de thymol, en présence d'assez fortes concentrations de sels de sodium.

La méthode de purification diffère peu du procédé décrit dans des publications antérieures^{14, 18}. On voit qu'elle repose exclusivement sur le fractionnement par le sulfate d'ammoniaque. Les essais de purification poursuivis, par le même procédé, au delà du stade V n'ont donné aucun résultat. La fraction désignée "V" par le Tableau I a été employée pour toutes les expériences décrites ici. Conservée avec un cristal de thymol comme antiseptique, elle est demeurée parfaitement stable pendant plus de huit mois, sans baisse mesurable d'activité. L'enzyme est très stable également à la température du laboratoire, et peut être conservé ainsi pendant de nombreux jours sans perte d'activité. Il est inactivé irréversiblement par dialyse prolongée contre de l'eau distillée.

TABLEAU I
PURIFICATION DE LA β -GALACTOSIDASE

Traitements	Fraction No.	Volume approximatif	Activité totale M/h*	Activité spécifique M/h/mg N**	Rendement %	Purification
I. 165 g de bactéries (poids humide) obtenues à partir de 30 l de culture, lavées deux fois à l'eau distillée, mises en suspension dans 600 ml d' H_2O avec 10 ml de toluène. Suspension agitée 1 h à 37°, puis abandonnée 2 h à 0°. Centrifugation	I	600	461 000	512	100	1
II. <i>Surnageant</i> additionné de $SO_4(NH_4)_2$ à saturation dans du PO_4KH_2 M/10, pH 7, jusqu'à 50% de saturation. Abandonné 12 h à 0°. Centrifugé. <i>Précipité</i> dissous dans 100 ml H_2O , dialysé contre du tampon phosphate M/10, pH 7.0.	II	100	456 000	1790	99	3.1
III. Fraction II amenée à 40% de saturation dans les mêmes conditions que ci-dessus. <i>Précipité</i> traité de la même façon.	III	100	342 000	3750	74	6.5
IV. Fraction III amenée à 33% de saturation par le sulfate d'ammoniaque. <i>Précipité</i> repris dans 20 ml de tampon pH 7.2.	IV	20	290 000	7020	63	12.2
V. Répétition du traitement précédent	V	20	235 000	7960	51	14

* Les activités sont supposées mesurées en présence de K^+ et en l'absence de Na^+ . Dans les cas où les mesures réelles avaient été faites en présence de Na, le facteur de correction approprié a été appliqué (cf plus loin, page 157).

** L'azote protéique est calculé *indirectement* à partir des valeurs de l'absorption à 280 m μ , déterminée sur la fraction précipitable par l'acide trichloracétique.

2. Hydrolyse du lactose

En présence de la préparation F V, le lactose est quantitativement hydrolysé en glucose et galactose, ainsi que le montrent les bilans résumés par le Tableau II. Le cours de la réaction, suivi par la technique à la notatine, dans l'appareil de WARBURG, avec différentes quantités initiales de lactose, est exprimé par les courbes de la Fig. 1. On observera que, d'après chacune des trois courbes de réaction figurant sur ce graphique, de l'oxygène continue d'être lentement consommé au-delà des valeurs théoriques (figurées par un trait interrompu horizontal). Ceci est dû, sans nul doute, à la lente oxydation du galactose par la notatine⁸. On voit d'ailleurs que l'intersection des tangentes menées à la première et à la dernière portion respectivement de la courbe figurative, se trouve sensiblement sur l'asymptote théorique.

La réaction est pratiquement insensible à la présence ou à l'absence d'ions PO_4 (comparez Tableaux III, V, VII). Cela permet d'éliminer l'hypothèse d'une phosphorolyse intermédiaire. L'enzyme présente donc les propriétés d'une hydrolase. L'activité de l'enzyme n'est pas affectée par la cystéine M/50, le cyanure M/50, le glutathion M/100 oxydé ou réduit.

La préparation F V s'est montrée dépourvue de toute activité mesurable en présence des disaccharides suivants: maltose, mélibiose, cellobiose, saccharose, tréhalose.

TABLEAU II
BILAN DE L'HYDROLYSE DU LACTOSE PAR LA β -GALACTOSIDASE

Lactose initial (μM)	Glucose libéré en fin de réaction (μM)	Galactose libéré en fin de réaction (μM)
5	4.97	4.95
10	9.99	9.97
15	15.1	14.9

Réactions effectuées en tampon PO_4KH_2 $M/10$, $\text{pH } 7$. Volume total 2 ml. Enzyme utilisé: $394 \mu M/\text{h}$ par tube. Durée de l'expérience 3 h. Température 28°C . En fin d'expérience, les tubes étaient portés à 100° pendant 3 min. Le glucose était dosé par la notatine sur un échantillon. Après oxydation du glucose, on dosait les sucres réducteurs restant, par la méthode de SOMOGYI-NELSON étalonnée par des solutions titrées de galactose contenant des quantités analogues des mêmes protéines. Le sucre réducteur demeurant après oxydation du glucose donnait l'osazone typique du galactose.

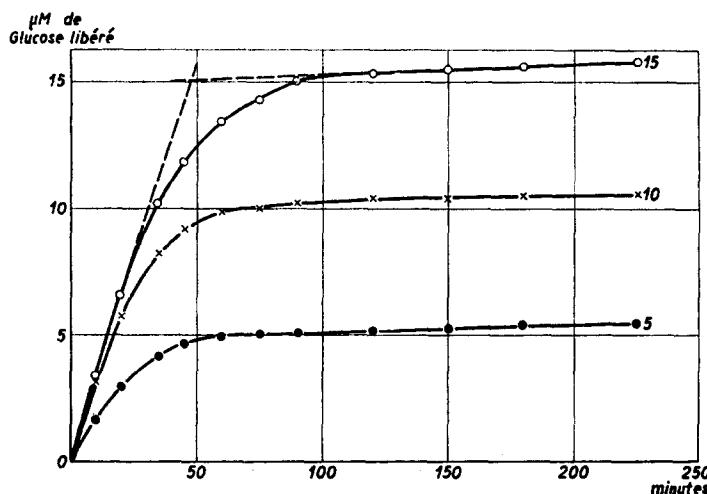


Fig. 1. Libération du glucose à partir du lactose, en présence de β -galactosidase. Réaction suivie par la technique à la notatine-catalase, dans l'appareil de WARBURG. Tampon PO_4KH_2 $M/10$, $\text{pH } 7.0$. Enzyme ajouté: $394 \mu M/\text{h}$ par fiole. Les chiffres en regard de chaque courbe indiquent le nombre de μM de lactose ajouté initialement.

3. Activations et inhibitions par les ions alcalins

Le Tableau III exprime les résultats de plusieurs séries de mesures d'activité effectuées avec du lactose comme substrat, et en présence de différents ions alcalins en concentrations croissantes. Les métaux étaient ajoutés, sous forme de chlorures, à une solution tampon de base (phosphate de triéthanolamine $M/20$)¹². Les résultats consignés dans la 7ème colonne du Tableau III montrent que l'activité enzymatique est pratiquement insensible aux variations de concentration de ce tampon qui peut donc être considéré comme "inerte". On observe cependant un léger effet de concentration du

tampon en présence de KCl (voir Tableau III, colonnes 8 et 9 et Fig. 2). Cet effet doit sans doute être rapporté aux variations de l'activité thermodynamique de l'ion K^+ en fonction de la force ionique de la solution. Nous appellerons "activité de base", l'activité mesurée en présence du tampon seul. On voit (1^{ère} colonne horizontale, 7^{ème} colonne verticale) que cette activité est remarquablement stable. Les chiffres donnés dans les 5 premières colonnes du tableau montrent que les ions alcalins exercent tous une action, parfois très marquée. Le potassium est un puissant activateur. Le rubidium et l'ammonium activent également, le sodium et le caesium activent légèrement. En présence de lithium, au contraire, l'activité enzymatique est fortement déprimée. Il s'agit bien là d'inhibition et non d'inactivation puisque: 1. l'effet est réversible (il disparaît en présence de fortes concentrations de potassium); 2. en présence de lithium $M/10$, l'activité de la lactase demeure constante pendant plus de 2 h à 28°.

L'inspection des graphiques exprimant l'activité en fonction de la concentration des divers ions (Fig. 2) révèle immédiatement que ceux-ci se distinguent non seulement par leurs propriétés d'activation, mais aussi par leur *affinité* pour l'enzyme. Il y aurait intérêt à préciser quantitativement cette notion. Cela est malheureusement difficile, car la variable à considérer n'est pas la concentration moléculaire, mais l'activité thermodynamique de chaque ion. Or, nous ne savons pas comment calculer, dans un tel système, l'activité thermodynamique. On peut cependant, comme première approximation, utiliser directement la concentration moléculaire et appliquer une équation du type MICHAELIS, en éliminant "l'activité de base" par soustraction. Ces artifices, arbitraires, il faut en convenir, permettent de calculer des constantes ayant une certaine valeur de comparaison. On trouve ainsi une "constante de dissociation" (apparente) de l'ordre de $3 \cdot 10^{-3} M$ pour le potassium, $2 \cdot 10^{-2} M$ pour le rubidium, $4 \cdot 10^{-2} M$ pour l'ammonium. Le calcul est évidemment impossible pour le sodium et le caesium qui n'activent que très faiblement. L'inspection de la Fig. 2 suggère cependant que l'affinité du sodium pour l'enzyme est très

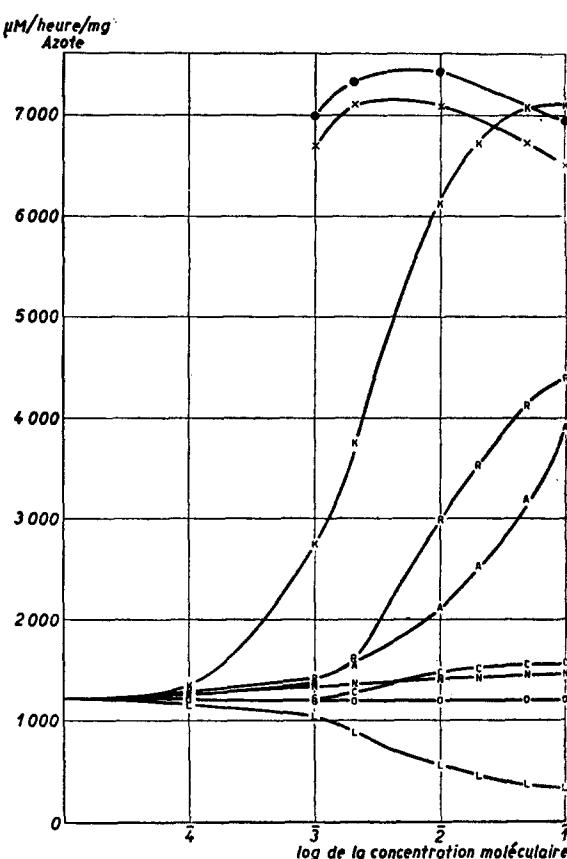


Fig. 2. Action des ions monovalents sur l'activité en lactose de la β -galactosidase.

K potassium	O triéthanolamine
R rubidium	L lithium
A ammonium	● phosphate de triéthanolamine
C caesium	en présence de $K^+ M/20$
N sodium	×
	phosphate de triéthanolamine
	en présence de $K^+ M/50$

Conditions: voir Tableau III

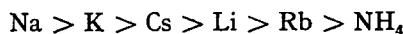
TABLEAU III

EFFETS DES CATIONS MONOVALENTS SUR L'ACTIVITÉ EN LACTOSE DE LA β -GALACTOSIDASE

Concentrations moléculaires	Activités en $\mu M/h/mg N$ en présence de:								
	K ⁺	Na ⁺	Cs ⁺	Rb ⁺	NH ₄ ⁺	Li ⁺	TEA PO ₄	TEA PO ₄ KCl M/50	TEA PO ₄ KCl M/20
0	1200	1200	1160	1180	1200	1210	—	—	—
10 ⁻⁴	1310	1250	1170	1290	1210	1160	—	—	—
10 ⁻³	2730	1360	1250	1420	1390	1070	1180	6690	6980
2 · 10 ⁻³	3710	1390	1290	1590	1560	866	1190	7100	7320
10 ⁻²	6110	1420	1480	2990	1890	585	1180	7070	7400
2 · 10 ⁻²	6720	1430	1490	3510	2510	450	—	—	—
5 · 10 ⁻²	7070	1440	1560	4130	3180	398	1200	6720	7070
10 ⁻¹	7090	1490	1550	4380	3920	386	1200	6490	6950

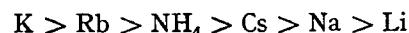
Mesures faites à 28° par la technique à deux temps en présence de tampon au phosphate de triéthanolamine pH 7.0. Les ions étaient ajoutés sous forme de chlorures. Les trois dernières colonnes donnent les activités en présence de différentes concentrations du tampon seul (7ème colonne) ou additionné de KCl M/50 ou M/20 (8ème et 9ème colonnes).

élevée, plus forte que celle du potassium. En définitive, les ions alcalins pourraient être rangés en ordre d'affinité décroissante pour l'enzyme, de la façon suivante:



non sans quelque incertitude sur l'ordre exact en ce qui concerne Cs et Li.

L'emploi de l'équation de MICHAELIS permet aussi de définir le pouvoir activateur, par une constante que nous appellerons l'"activance". Ce sera le rapport de l'activité à saturation par l'ion à l'activité de base. On trouve les valeurs suivantes qui imposent, on le voit, un classement bien différent de celui que donnait l'affinité:



6.1 4.7 4.3 1.3 1.2 0.3

Ces chiffres n'ont qu'une valeur relative. L'essentiel, c'est que cette brève analyse des résultats met en évidence l'*indépendance entre l'affinité et l'activance des ions alcalins*. C'est là une notion intéressante qui permet d'interpréter les effets d'antagonisme rapportés dans la section suivante.

4. Compétitions et antagonismes ioniques

Nous venons de voir que l'ion sodium doit être considéré comme un activateur de la lactase. Des expériences préliminaires nous avaient cependant conduit à le classer comme un inhibiteur. Dans ces expériences, nous utilisions une solution tampon de base au phosphate d'ammoniaque M/100. Nous observions alors une activation par le potassium, mais une *inhibition* par le sodium (Fig. 3). Cette contradiction apparente s'explique aisément par la haute affinité et la faible activance du sodium, opposée à la faible affinité et à la forte activance de l'ammonium. Cette interprétation est pleinement confirmée par l'étude de "l'antagonisme" entre le sodium et le potassium (Tableau IV et Fig. 4). On voit qu'*en présence de potassium*, le sodium agit comme un puissant inhibiteur: avec du potassium M/100, et du sodium à concentration égale, l'inhibition est de 86%; à concentration vingt fois plus faible de sodium, l'inhibition atteint encore

36%. Il est clair cependant qu'entre les deux ions il n'y a pas à proprement parler antagonisme puisque leurs effets individuels sont qualitativement les mêmes. Il y a, en réalité, *compétition entre deux activateurs d'affinité et d'activance différentes*.

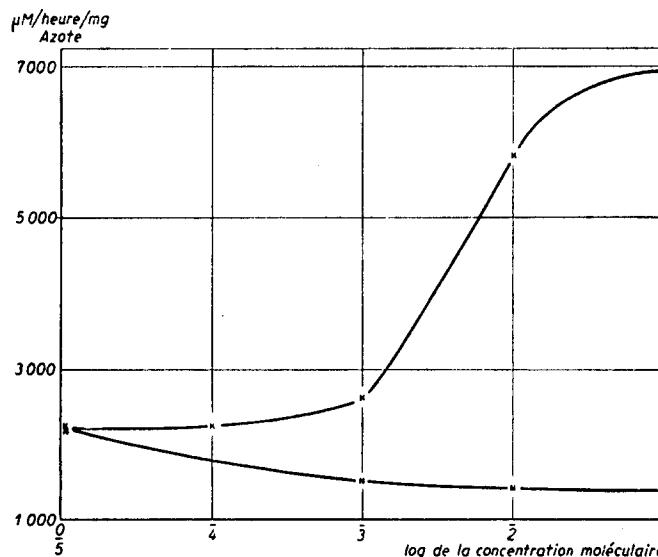


Fig. 3. Action du potassium et du sodium sur l'hydrolyse du lactose par la galactosidase en présence d'ammonium. Potassium et sodium ajoutés sous forme de chlorures à une solution tampon préparée par neutralisation à pH 7.0 d'acide phosphorique $M/100$ par de l'ammoniaque. Cette solution était donc environ $M/50$ en NH_4^+ . Mesures des activités à 28° par la méthode à deux temps.

Les résultats dans leur ensemble sont en bon accord avec cette interprétation: on voit (Tableau IV) que l'activité dépend du rapport des concentrations plutôt que des concentrations absolues; un calcul approximatif indique que l'affinité du sodium pour l'enzyme est environ vingt fois plus élevée que celle du potassium. On ne saurait pourtant passer sous silence le fait qu'à forte concentration de potassium ($M \cdot 10^{-1}$), l'addition

TABLEAU
EFFETS COMPÉTITIFS DU SODIUM ET DU POTASSIUM
Activités ($\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg N}$) en présence

Conc. Na^+ mol K^+	0	10^{-4}	$2 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$
0	1200	1250			
10^{-4}	1310				
10^{-3}	2730	2440	2230	2120	1880
$2 \cdot 10^{-3}$	3710	3180	2730		2210
10^{-2}	6110	5640	5070		4320
$2 \cdot 10^{-2}$	6720	6550	6400		
$4 \cdot 10^{-2}$	7000				
$5 \cdot 10^{-2}$	7070	7210	7100		
10^{-1}	7090	7280	7180		

* Activités mesurées par la technique à deux temps à 28° en phosphate de triéthanolamine $M/20$, pH 7.00.

Bibliographie p. 174.

de traces de sodium ($M \cdot 10^{-4}$) provoque une très faible activation (2.5%). Ce léger effet montre que la situation est plus complexe que notre interprétation ne le suppose. Mais il ne s'agit en tous cas que d'une approximation. Il est extrêmement tentant de généraliser cette interprétation en supposant que *tous les cations monovalents* sont en réalité des *activateurs* de la lactase et se différencient uniquement par leur affinité et leur activance. L'activité "de base" serait alors due aux ions H^+ de l'eau. L'effet inhibiteur du lithium serait dû à ce que son activance serait plus faible que celle des ions H^+ avec lesquels il entrerait en compétition.

5. Action des ions bivalents

Le Tableau V résume quelques données sur l'action des ions bivalents. On voit que tous, à l'exception du magnésium, agissent comme des inhibiteurs. Il convient d'ailleurs de faire des réserves en ce qui concerne le cuivre et le zinc dont l'effet n'est pas réversible par addition de potassium et ne peut donc être considéré comme une inhibition mais constitue plutôt une inactivation. Le Tableau VI montre qu'il y a "anta-

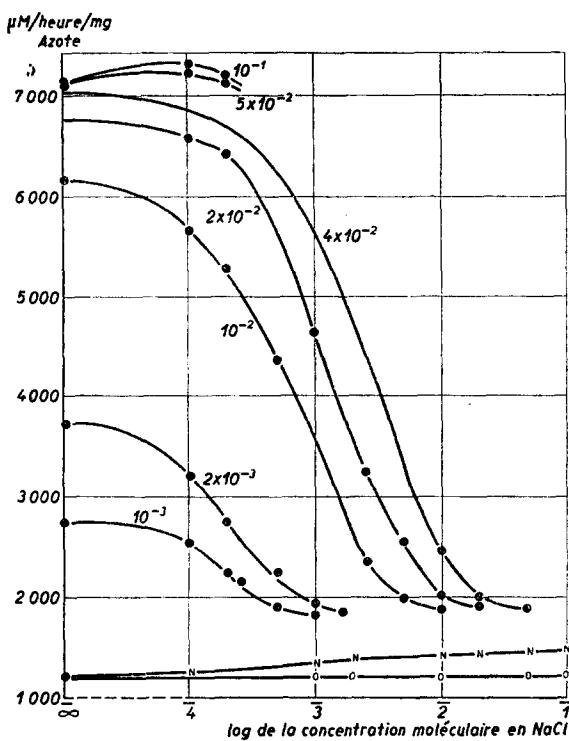


Fig. 4. Effets compétitifs du sodium et du potassium sur l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidase. Les chiffres en regard de chaque courbe indiquent la concentration moléculaire en potassium
 —○—○ activité de base (sans K^+ ni Na^+)
 N activité en sodium seul
 Conditions: voir Tableau IV.

V

UR L'ACTIVITÉ EN LACTOSE DE LA β -GALACTOSIDASE*

e différents mélanges des deux ions

10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$
1360	1390			1410	1430	
1810						
1900	1840					
4620	3240	2340	1990 2530	1870 2010 2470	1900 1990	1880

sodium et potassium ajoutés sous forme de chlorures.

Bibliographie p. 174.

TABLEAU V
EFFETS DES CATIONS BIVALENTS SUR L'ACTIVITÉ EN LACTOSE
DE LA β -GALACTOSIDASE*

Ion	Concentrations moléculaires	Activité ($\mu M/h/mg N$)	Inhibition %	Activation %
$Cu^{++}(SO_4)$	10^{-3}	0	100	—
$Zn^{++}(SO_4)$	10^{-3}	0	100	—
$Ca^{++}(Cl)$	10^{-1}	95	87.5	—
$Mn^{++}(Cl)$	$2 \cdot 10^{-2}$	452	62	—
$Co^{++}(Ac)$	10^{-3}	498	58	—
$Fe^{++}(SO_4)$	$2 \cdot 10^{-2}$	762	36	—
$Sr^{++}(Cl)$	$2 \cdot 10^{-2}$	202	83	—
$Mg^{++}(SO_4)$	$2 \cdot 10^{-2}$	1300	—	9.3
Sans addition		1200	—	—

* Activités mesurées par la technique à deux temps à 28° en tampon au cacodylate de triéthanolamine $M/20$, $pH 7.0$. D'après des tests effectués avec la protéase de GORINI⁷, ce corps ne complexe pas le calcium. Des contrôles avaient été institués pour vérifier que le titrage du glucose par la notatine restait correct en présence des ions bivalents.

TABLEAU VI
EFFETS COMPÉTITIFS DU POTASSIUM ET DU CALCIUM SUR L'ACTIVITÉ
EN LACTOSE DE LA β -GALACTOSIDASE

Activités ($\mu M/h/mg N$) en présence de différents mélanges des deux ions*

Concentrations K^+ moléculaires Ca^{++}	0	$2 \cdot 10^{-2}$	10^{-2}
0	1240	6620	6600
10^{-3}	1200	6580	3640
10^{-2}	1190	3350	1750
$2 \cdot 10^{-2}$	1170	1950	1070
10^{-1}	99-108	270	184

* Activités mesurées par la technique à deux temps, à 28°, en présence de cacodylate de triéthanolamine, $pH 7.0$. Les ions étaient ajoutés sous forme de chlorures. La solution de $CaCl_2$ était préparée par dissolution dans HCl d'une quantité exacte de CO_3Ca pur.

TABLEAU VII
EFFETS DE QUELQUES ANIONS SUR L'ACTIVITÉ EN LACTOSE
DE LA β -GALACTOSIDASE

Anion ($M/10$)	Activité ($\mu M/h/mg N$)	Anion ($M/10$)	Activité ($\mu M/h/mg N$)
Cl^-	7130	NO_3^-	6460
Br^-	7200	NO_2^-	4280
I^-	6190	SO_4^{2-}	6910
IO_3^-	4200	Cacodylate	7180

Mesures effectuées en tampon au phosphate de triéthanolamine $M/20$, $pH 7.0$. Anions ajoutés sous forme de sel de potassium ($M/10$). "Cacodylate" = essai effectué en tampon au cacodylate de triéthanolamine $M/10$, $pH 7.0$, additionné de $KCl M/10$. Technique à deux temps.

gonisme" entre le calcium et le potassium. Les données ne sont pas assez nombreuses pour que l'on puisse conclure qu'il s'agit exclusivement d'un effet de compétition. Les résultats suggèrent pourtant que cet antagonisme pourrait être au moins en partie l'expression d'un phénomène de compétition entre un activateur puissant (K^+) et un activateur faible ou très faible (Ca^{++}) en présence d'un activateur moyen (H^+ ?).

L'action légèrement activante du magnésium n'est probablement pas due à une impureté et semble authentique. Le Tableau VII montre que les anions utilisés dans les expériences précédentes sont sans effet spécifique sur l'activité de la galactosidase. On notera à ce propos, sans surprise, les effets inhibiteurs ou inactivants des anions NO_3^- , NO_2^- , I^- , IO_3^- .

6. Activité en fonction du p_H

La Fig. 5 donne les résultats de plusieurs séries de mesures d'activité effectuées entre p_H 4 et p_H 10, en présence de différents cations monovalents ($M/10$) et de tampon au phosphate de triéthanolamine ($M/20$). On voit que le maximum, à p_H 7, est particulièrement marqué en présence de potassium, très net encore avec le rubidium et l'ammonium, à peine indiqué pour les ions faiblement activants.

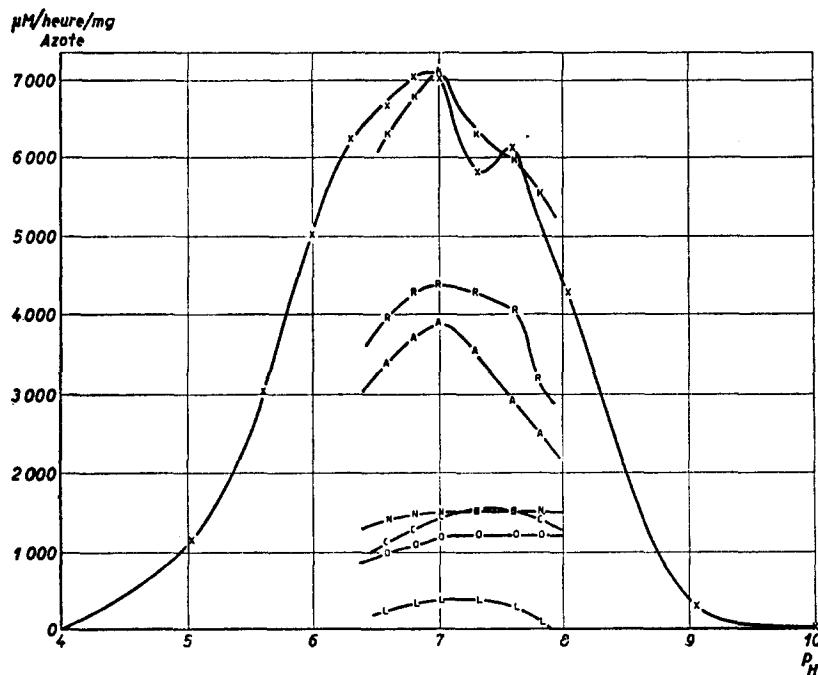


Fig. 5. Activité de la β -galactosidase en fonction du p_H en présence de lactose et de différents cations monovalents

- K phosphate de triéthanolamine $M/20 + KCl$ $M/10$
- R phosphate de triéthanolamine $M/20 + RbCl$ $M/10$
- A phosphate de triéthanolamine $M/20 + NH_4Cl$ $M/10$
- N phosphate de triéthanolamine $M/20 + NaCl$ $M/10$
- C phosphate de triéthanolamine $M/20 + CsCl$ $M/10$
- L phosphate de triéthanolamine $M/20 + LiCl$ $M/10$
- O phosphate de triéthanolamine $M/20$ sans addition
- X phosphate de potassium $M/10$

On a porté également sur cette figure une série d'activités mesurées dans un tampon au phosphate de potassium. On voit que dans ce cas la courbe d'activité se creuse à p_{H} 7.3 et se relève à p_{H} 7.8. Nous ne savons comment interpréter cet effet, lié à la nature du tampon, et qui ne semble pas pouvoir être attribué à la présence de deux enzymes distincts (voir plus loin). Soulignons que la galactosidase est stable entre les limites des p_{H} employés (4 à 10) et retrouve sa pleine activité lorsque le p_{H} est ramené à l'optimum.

7. Hydrolyse du niphégal

LEDERBERG (communication personnelle) a démontré l'existence dans des extraits d'*E. coli* (souche K 12) adapté au lactose, d'une " β -galactosidase" très active, notamment envers le niphégal. La question de l'identité de cet enzyme et de la "lactase" de la souche "ML" se posait donc. La préparation F IV s'est montrée excessivement active en présence de niphégal. Ce corps est hydrolysé quantitativement en *o*-nitrophénol et galactose. C'est du moins ce que montrent les bilans de réaction, compte tenu du fait que la préparation de niphégal utilisée contenait une forte proportion (12%) d'impuretés, probablement du galactose libre.

LEDERBERG avait signalé que sa β -galactosidase était activée par le sodium. Les chiffres portés dans les trois premières colonnes du Tableau IX permettent d'apprécier l'effet du sodium et du potassium respectivement sur l'hydrolyse du niphégal par notre préparation. En moyenne, l'activité de base est multipliée par 3 en présence de $\text{KCl } M/10$ et par 5 en présence de $\text{NaCl } M/10$. *Le sodium est donc en présence de niphégal un activateur plus puissant que le potassium.* Cette différence remarquable, cette "inversion" de l'activance du potassium et du sodium (par rapport aux résultats obtenus avec le lactose) suggérait que deux enzymes distincts étaient en cause. Cette hypothèse sera considérée dans les paragraphes qui suivent. Le même tableau (colonne 1-4) montre que l'activité de la préparation, exprimée en μM de substrat hydrolysé par unité de temps est trois fois plus forte environ avec le niphégal qu'avec le lactose comme substrat.

8. Analyse électrophorétique

Deux essais de séparation électrophorétique ont été conduits avec la préparation F IV. Les conditions de ces expériences sont données dans les légendes des figures correspondantes. Deux constituants (ou groupes de constituants) bien distincts apparaissent dans le diagramme de l'expérience 1 (Fig. 6). L'un et l'autre avaient tendance à s'étaler et à devenir asymétriques. D'après l'analyse des diagrammes, 91% des protéines totales se trouvaient dans le constituant principal. Une fraction, correspondant au constituant mineur le plus rapide (A) fut isolée dans la moitié supérieure de la branche *ascendante* de la cellule, tandis qu'une autre fraction, correspondant au constituant principal, le plus lent, (fraction D) était prélevée dans la moitié supérieure de la branche descendante.

L'activité sur le lactose de ces deux fractions fut déterminée (aussitôt après la séparation) en présence de potassium (Tableau VIII). On voit que ces *deux fractions*, pourtant bien distinctes sur les diagrammes, possèdent de l'activité, encore que l'une (fraction A 1) soit près de trois fois plus active que l'autre (fraction D 1).

Devant ce résultat assez surprenant un second essai de séparation fut tenté, dans des conditions plus sévères, c'est à dire permettant l'application d'un potentiel plus élevé, afin d'obtenir une résolution maximum. On notera d'ailleurs l'étalement marqué et l'aspect fortement dissymétrique des diagrammes. Seuls les bords antérieurs et pos-

térieurs des frontières furent isolés, dans les branches ascendante et descendante respectivement. Toute possibilité de contamination d'une fraction par l'autre semble avoir été exclue. Ici encore, cependant, les deux fractions se montrent actives (Tableau VIII) et le rapport de leurs activités égal à 2.9 est du même ordre que dans l'expérience précédente où il est égal à 2.45.

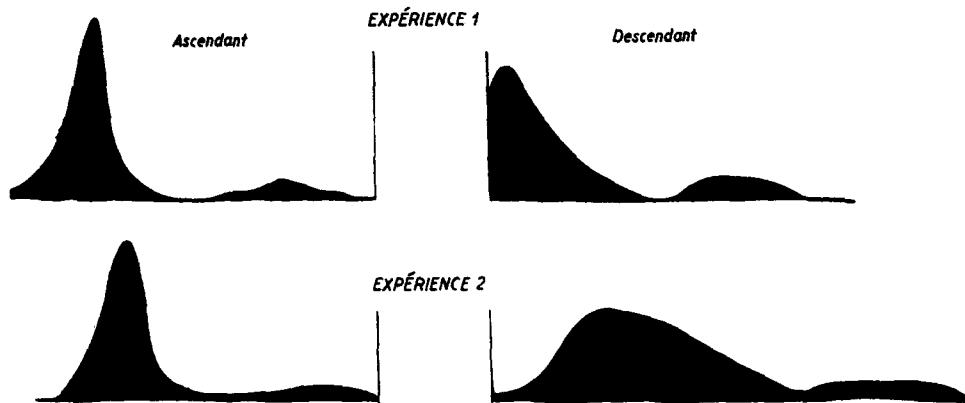


Fig. 6. Electrophorèse de la préparation FV.

Exp. 1
 Protéine % 1.3
 Tampon $\left\{ \begin{array}{l} \text{phosphate-K 0.02 M} \\ \text{NaCl (0.18 M)} \\ \text{pH 7.4} \\ \text{force ionique 0.2} \end{array} \right.$
 Durée 83 minutes
 Potentiel 4.85 V/cm

Exp. 2
 Protéine % 1.4
 Tampon $\left\{ \begin{array}{l} \text{cacodylate-K 0.01 M} \\ \text{pH 7.2} \\ \text{force ionique 0.01} \end{array} \right.$
 Durée 135 minutes
 Potentiel 19 V/cm

Séparation des fractions effectuées dans une cellule à 4 éléments après compensation adéquate de la progression des frontières

TABLEAU VIII
 FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DE LA PRÉPARATION FV

Activités en lactose des fractions ascendantes et descendantes isolées au cours des expériences 1 et 2 (Fig. 6).

Fractions	Activité ($\mu M/h/mg N$) en présence de		Rapports des activités K^+/Na^+
	$K^+ M/10$	$Na^+ M/10$	
A1	13 890	3 112	4.45
D1	5 960	1 210	4.92
A2	18 500	3 810	4.85
D2	6 210	1 360	4.55
FV	7 090	1 490	4.75
			Moyenne 4.7 \pm 5%

Mesures effectuées à 28° par la technique à deux temps, en tampon phosphate (de potassium ou de sodium) $M/10$, pH 7.0. A1 et A2 = fractions "ascendantes"; D1 et D2 = fractions "descendantes", isolées au cours des expériences 1 et 2 respectivement.

Bibliographie p. 174.

La comparaison des activités en présence de sodium et de potassium respectivement offrait un moyen supplémentaire d'identification. On voit (Tableau VIII) que le rapport de ces activités est sensiblement le même pour les deux fractions, et pour la préparation originale.

L'activité de ces diverses fractions en présence de niphégal fut déterminée plusieurs mois plus tard. Entre temps ces solutions, très diluées, avaient perdu une partie de leur activité. Ce fait ne semble rien enlever (au contraire) à la valeur probante des résultats, donnés par le Tableau IX. Il est clair que les rapports des activités mesurées dans différentes conditions (présence d'ions K ou Na) avec le niphégal et surtout le rapport particulièrement caractéristique de l'activité en niphégal à l'activité en lactose, ne diffèrent pas de façon significative, pour aucune des fractions, des valeurs trouvées pour la préparation non fractionnée.

TABLEAU IX
FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DE LA PRÉPARATION FV

Activités comparées des fractions ascendantes et descendantes en lactose et en niphégal

Fractions	Activités ($\mu M/h/ml$) en				Rapports des activités		
	niphégal en présence de			Lactose en présence de			
	PO_4 TEA (1)	$K^+ M/10$ (2)	$Na^+ M/10$ (3)	$K^+ M/10$ (4)	(3)/(4)	(3)/(2)	(3)/(1)
A ₁	33.9	116	177	51.3	3.44	1.52	5.2
D ₁	7.05	17.4	28.0	9.3	3.01	1.60	3.9
A ₂	23.9	68.0	118.0	42.1	2.80	1.72	5.1
D ₂	?	1.01	1.56	?	—	1.55	—
Non fractionné	3 480	10 800	15 100	3 940	3.83 Moyenne $3.3 \pm 10\%$	1.40 Moyenne $1.56 \pm 5\%$	4.4 Moyenne $4.75 \pm 12\%$

Mesures effectuées deux mois après l'électrophorèse. Tampon au phosphate de triéthanolamine (PO_4 TEA) $M/10$, pH 7.0. Potassium et sodium ajoutés sous forme de chlorures. Pour le niphégal, mesures au spectrophotomètre Beckman à 26° environ. Pour le lactose, technique à deux temps à 28°. A₁, A₂, D₁, D₂ = fractions ascendantes (A) et descendantes (D) isolées au cours des expériences 1 et 2 respectivement. On notera que les activités sont données en $\mu M/h$ par ml et non par mg d'N.

L'analyse électrophorétique met donc en évidence au moins deux constituants distincts dans notre préparation. Mais les tests, assez sévères cependant, dont nous disposons, ne permettent pas de différencier ces constituants principaux par leurs propriétés enzymatiques caractéristiques.

9. Inactivation thermique

Les résultats donnés par le Tableau X permettent de comparer les vitesses d'inactivation thermique de la "lactase" et de la "niphégalase" à 50.6° C. Des essais préliminaires avaient montré qu'à 55° C l'inactivation était totale en moins d'une minute, tandis qu'à 47.3° C elle était de moins de 5% en 10 minutes. La réaction d'inactivation est sensiblement du 1er ordre (Fig. 7). Les résultats obtenus pour les deux séries de mesures ("lactase" et "niphégalase") sont pratiquement équivalents.

TABLEAU X
INACTIVATION THERMIQUE DE LA β -GALACTOSIDASE

Comparaison des activités en lactose et en niphégal au cours de la dénaturation à 50.6° C

Temps en minutes	0	2	6	9
Activité en niphégal ($\mu M/h$)	5480	3000	1020	335
Activité en lactose ($\mu M/h$)	1650	878	279	122
Rapport niphégal/lactose	3.3	2.9	3.6	2.7

Expériences effectuées par la technique suivante²¹: des tubes en verre à parois minces étaient placés dans un thermostat à 50.6° C. On mesurait dans chaque tube 0.3 ml d'une solution concentrée d'enzyme, en phosphate de triéthanolamine $M/10$, pH 7.0. Une minute plus tard (temps nécessaire pour que l'équilibre de température fut atteint) on prélevait dans chaque tube un échantillon qui était immédiatement dilué dans du tampon à 0° C. Ce moment était arbitrairement considéré comme le temps 0. Les échantillons suivants étaient prélevés de la même manière au moment voulu, et dilués de façon à tenir compte approximativement de la perte d'activité. Ils étaient ensuite additionnés de NaCl ($M/10$) pour les mesures d'activité en niphégal et de KCl ($M/10$) pour les mesures d'activité en lactose. Les premières étaient effectuées à 26° C par la technique décrite (p. 154), les secondes à 28° C par la technique à 2 temps.

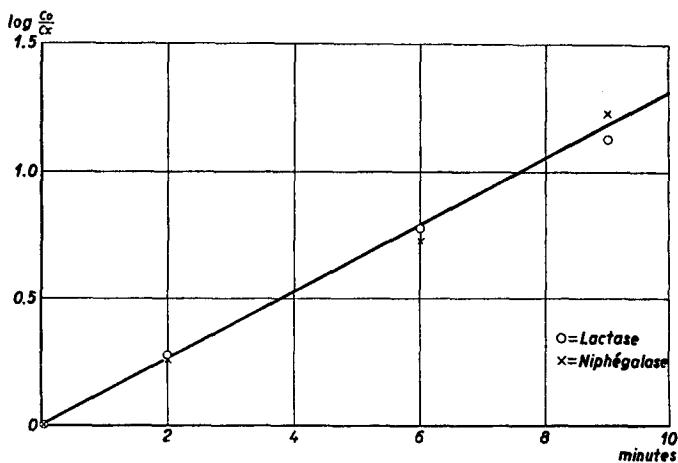


Fig. 7. Inactivation thermique de la β -galactosidase. Activités mesurées en lactose ("lactase") et en niphégal ("niphégalase"). Co = activité au temps 0. Cx = activité au temps considéré. Technique des mesures, voir légende du Tableau X

10. Propriétés immunochimiques

Une préparation de pseudo-globuline anti-galactosidase obtenue à partir du sérum de lapins immunisés par injection de la préparation d'enzyme (v. Tableau XI) possérait un titre élevé en anticorps précipitant. Cette préparation d'anti-galactosidase précipitait également la "lactase" d'autres espèces ou souches de bactéries coliformes (*Aerobacter aerogenes*, *E. coli* souche K-12). Elle ne réagissait pas avec la lactase de *Saccharomyces fragilis*.

Bibliographie p. 174.

TABLEAU
ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE

Réaction de précipitation				Analyse des	
Antigène ajouté en $\mu\text{g d'N}$	Lactase ajoutée en unités d'activité ($\mu\text{M/h}$)	Niphégalase ajoutée en unités d'activité ($\mu\text{M/h}$)	Précipité formé $\mu\text{g N}$	par la réaction de précipitation	
				Présence d'anticorps	Présence d'antigènes
5.5	39.3	124	73.1	+	Tr
11.1	78.6	248	95.2	+	Tr
16.6	118	372	93.2	+	+
27.7	196	620	87.6	Tr	+
33.2	236	744	85.3	Tr	+
38.8	275	868	74.1	o	+
44.3	314	992	60.4	o	+
55.4	393	1240	43.2	o	+
66.5	472	1490	18.9	o	+
Témoin: antigène + tampon					
11.1	78.6	248			
Témoin: antigène + pseudoglobuline "normale"					
11.1	78.6	248			

Technique quantitative pour la réaction de précipitation⁸

Anticorps: 0.2 ml de la préparation de pseudoglobuline. Tampon phosphate de potassium $M/10$, pH 7.0. Volume total 2 ml. La précipitation est complète après 7-8 jours à la glacière. Mesures d'activité dans les liquides surnageants effectuées simultanément sur tous les échantillons. Lactose: technique à 2 temps, 28°. Niphégal: mesures au spectrophotomètre Beckman, 27°.

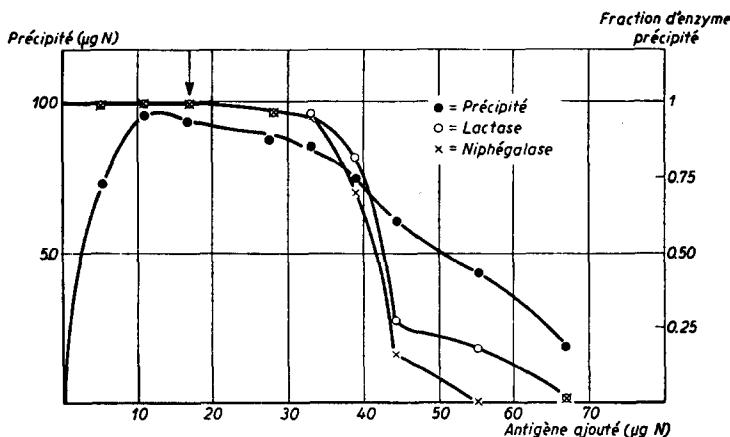


Fig. 8. Réaction de précipitation entre la préparation FV et le sérum homologue. Les points noirs donnent les poids (en équivalent-N) de précipité formé, en fonction de la quantité d'antigène ajouté. La "fraction d'enzyme précipité" est calculée pour la "lactase" comme pour la "niphégalase", d'après les valeurs de l'activité enzymatique du liquide surnageant après élimination du précipité. Conditions: voir légende du Tableau XI.

XI

DE LA PRÉPARATION FV

liquides surnageants				Rapport niphégalase lactase	
par l'activité enzymatique					
lactase	niphégalase	Activité	% en solution		
Activité	% en solution	Activité	% en solution		
0	0	0	0	—	
0	0	0	0	—	
0	0	Tr	0	—	
5.14	2.6	18.4	3.0	3.58	
9.26	3.9	39.2	5.2	3.66	
51.0	18.5	250	29.0	4.42	
230	73	738	84	3.20	
320	82	1220	99	3.82	
465	99	1500	100	3.22	
78.6		248.0		3.16	
77.9		254.0		3.26	
				Moyenne 3.54 ± 10%	

Préparation de pseudoglobuline anti-galactosidase

Six lapins reçoivent chacun 125 µg de protéine de la préparation FV, injectés par la technique de FREUND ET BONANTO⁶. Témoin "normal", mêmes sérums avant immunisation. Isolement de la fraction pseudoglobulinique par 3 précipitations au sulfate d'ammoniaque à 33% et dialyse contre de l'eau distillée.

Le précipité spécifique, lavé par centrifugation, conservait intégralement l'activité enzymatique. Il en était de même des complexes solubles antigène-anticorps, formés en présence d'un excès d'antigène. C'est grâce à ces propriétés que nous avons pu mettre au point une technique de titrage (Tableau XI) dont le principe consiste à utiliser l'activité enzymatique non précipitée pour déterminer le point d'équivalence. Ce titrage étant basé sur une propriété spécifique de l'antigène, les résultats sont indépendants de toutes autres réactions dues à des anticorps étrangers. C'est ainsi que le titrage de l'anticorps, soit par la préparation de galactosidase purifiée, soit par des extraits bruts, donnait sensiblement les mêmes résultats. (Il semble cependant qu'un anticorps spécifique d'une protéine étrangère à l'enzyme était présent, mais ne constituait qu'une petite fraction de l'anticorps total. Nous y reviendrons dans un instant).

Des extraits bruts de bactéries *non adaptées*, extraits qui ne possédaient que des traces à peine mesurables d'activité précipitaient spécifiquement l'anti-lactase. Une protéine douée de propriétés immunologiques très semblables, sinon identiques à celles de la lactase, est donc présente dans les bactéries non adaptées. Nous laisserons de côté, ici, le problème des rapports structuraux et ontogéniques de ces deux protéines, problème dont nous poursuivons l'étude.

Une analyse quantitative de la réaction entre lactase purifiée et pseudoglobuline

anti-lactase est donnée par le Tableau XI. L'activité enzymatique des liquides surnageants a été déterminée en présence de lactose et de niphégal. On voit que jusqu'à 16.62 μ g d'antigène ajouté, le liquide surnageant est dénué de toute activité. Au-delà commence la zone d'excès d'antigène. Le pourcentage d'activité demeurant en solution s'accroît; les deux séries de mesures d'activité ("lactase" et "niphégalase") donnent des résultats équivalents aux erreurs près. Aucune tendance à une dissociation des deux activités ne se manifeste. Elles sont donc associées toutes deux à un même antigène, homogène quant à la spécificité immunologique. La même expérience a été répétée avec des extraits non purifiés. Les résultats en ont été essentiellement semblables.

Notons qu'au delà de 55 μ g d'équivalents-N d'antigène ajouté, tout l'enzyme demeure en solution. Cependant, il y a encore précipitation jusqu'à 66.5 μ g d'équivalents N ajoutés. Cette précipitation est évidemment due à une impureté de la préparation, et à l'anticorps correspondant. Nous avons là un exemple de plus de la valeur de la réaction de précipitation dans la zone d'excès d'antigène pour la détection immunologique de certaines impuretés^{3,4}.

DISCUSSION

1. La "lactase" purifiée que nous avons étudiée hydrolyse le lactose et le niphégal. Ces corps n'ont en commun que le radical β -galactoside. Nous pouvons ajouter ici (quoique nous n'ayons pas étudié quantitativement cette réaction) que le β -méthylgalactoside est également hydrolysé. En revanche, la préparation est totalement inactive envers tous ceux des glucides essayés qui ne contiennent pas la liaison β -galactosidique.

Aucun des tests ou essais de séparations effectués (électrophorèse, précipitation par le sérum spécifique, inactivation thermique) ne permet de dissocier, même partiellement, les activités mesurées en présence soit de lactose, soit de niphégal. Tous ces résultats indiquent donc qu'un même enzyme est responsable de l'hydrolyse des deux substrats. Il est plus que probable que cet enzyme spécifique de la configuration β -galactosidique est, au moins partiellement, indifférent à la structure de la fraction aglycone. Ce serait donc une β -galactosidase et il est préférable de renoncer à l'appellation de "lactase" employée dans des publications précédentes (*loc. cit.*). Cet enzyme paraît identique par son activité enzymatique aussi bien que par sa spécificité antigénique à celui que J. LEDERBERG (communication personnelle) a extrait de la souche K-12 d'*E. coli* et dont il a observé l'activation par le sodium en présence de niphégal. Notre enzyme est distinct au point de vue immunologique de la "lactase" de levure, mais il se pourrait qu'il en fut assez proche au point de vue chimique, car la lactase de levure est également activée par le sodium et le potassium (DAVIES, communication personnelle). Les données publiées sur des "lactases" et des " β -galactosidases" d'autres sources ne nous permettent pas de faire de comparaisons ou de rapprochements utiles. Nous n'aborderons pas ici le problème de la spécificité des galactosidases. On doit pourtant remarquer que la β -galactosidase de l'émulsine n'a pu jusqu'à présent être séparée ou distinguée nettement de la β -glucosidase¹⁰. Notre préparation semble au contraire dépourvue de toute activité sur les β -glucosides.

2. En étudiant avec quelque soin l'effet des ions sur l'activité de cet enzyme, nous avions simplement pour but de préciser des propriétés caractéristiques. Les effets

d'activation par les ions alcalins, et surtout les phénomènes de "pseudoantagonisme" observés au cours de cette étude méritent pourtant de retenir l'attention. La galactosidase purifiée constitue un matériel de choix pour l'étude de ce type d'effets dont il est inutile de souligner l'importance. On sait que le potassium est indispensable à la croissance de plusieurs bactéries^{11, 12, 13}. SNELL et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence des rapports *compétitifs* entre Na^+ , NH_4^+ et K^+ pour la croissance des streptocoques et lactobacilles. Ils ont montré que ces effets compétitifs pouvaient rendre compte de certains antagonismes. De très nombreux effets d'activation et d'inhibition de systèmes enzymatiques plus ou moins complexes par des cations monovalents ont été signalés^{1, 2, 10, 20, 24}.

On possède beaucoup moins de données se rapportant à des enzymes isolés ou cristallisés. Les plus complètes concernent la myosine²³.

Deux indications principales se dégagent des observations que nous avons exposées ici. D'abord, que la notion assez obscure d'*antagonisme ionique* pourrait, dans beaucoup de cas peut-être, se ramener à l'idée plus claire de *compétition*. Nous avons vu comment le sodium, activateur de la galactosidase exerce cependant une action inhibitrice en présence d'un autre ion, le potassium, activateur puissant, mais doué de moins d'affinité pour l'enzyme. Nous avons vu également que les résultats concernant les cations monovalents y compris les effets inhibiteurs du lithium pourraient s'expliquer de façon analogue, à la condition d'admettre que, comme les autres cations, ceux de l'eau (ions H^+) sont doués d'affinité pour l'enzyme et de pouvoir activant.

L'affinité et l'"activance" de chaque ion suffiraient dans cette hypothèse à définir ses propriétés, et la connaissance de ces valeurs permettrait de calculer l'activité enzymatique en présence de n'importe quel mélange d'ions.

La vérification de ces hypothèses assez simples, satisfaisantes en ce qu'elles réduiraient à des différences *quantitatives* (affinité, activance) les différences *qualitatives* qu'implique la notion d'antagonisme ne paraît pas impossible en principe, mais exigera des recherches approfondies.

La comparaison des résultats obtenus soit avec le lactose, soit avec le niphégal, accroît encore l'intérêt de ces phénomènes captivants. Elle suggère que l'activance d'un ion est une propriété qui dépend non seulement de l'enzyme et de l'ion, mais encore du substrat. Nous avons vu en effet qu'en présence de lactose le potassium est un meilleur activateur que le sodium, alors que c'est l'inverse en présence de niphégal. On ne connaît pas jusqu'à présent, croyons-nous, d'exemple d'une telle situation. Les observations exposées ici sont malheureusement très incomplètes en ce qui concerne l'hydrolyse du niphégal. Nous comptons reprendre ce problème en comparant systématiquement l'activance des divers ions en présence d'une série assez variée de β -galactosides employés comme substrat.

3. Il est difficile d'interpréter les résultats de l'analyse électrophorétique montrant que l'activité enzymatique est associée avec des protéines de propriétés électriques différentes. Les deux fractions isolées par électrophorèse ne se différencient en rien par leurs propriétés enzymatiques si ce n'est l'activité absolue. Or cela est d'autant plus significatif que les propriétés très caractéristiques de cet enzyme constituent d'excellents critères d'identification. De plus, l'analyse immunologique indique que l'activité enzymatique est associée à une seule espèce antigénique.

Il est possible que les résultats de l'électrophorèse soient dûs à un artefact de préparation. L'analyse d'autres préparations, effectuées éventuellement par d'autres

méthodes, permettrait de vérifier cette possibilité*. Peut-être aussi ces observations doivent-elles être rapprochées de la découverte, dans les extraits de bactéries non adaptées (extraits dépourvus de galactosidase) d'une protéine (Pz) précipitant spécifiquement avec l'anti-galactosidase. L'hypothèse selon quoi cette protéine serait le précurseur de la galactosidase se présente d'elle-même, et fait l'objet de recherches que nous poursuivons actuellement. Toutefois, on peut dire dès maintenant que, d'après des dosages immunologiques, la préparation utilisée pour ce travail contenait environ 40% de protéine Pz. Si d'autre part on suppose que la fraction rapide ("A", p. 165) représente la galactosidase "pure", on doit en déduire que la préparation contenait 39% d'enzyme actif, et 21% d'une (ou plusieurs) protéines antigéniquement différentes des deux premières. Ce calcul approximatif repose sur plusieurs hypothèses qui demanderont à être justifiées et discutées d'une façon beaucoup plus approfondie.

RÉSUMÉ

1. Une technique de purification de la β -galactosidase (lactase) adaptive de *E. coli* est décrite.
2. Le lactose et l'*o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (niphégal) sont quantitativement hydrolysés en présence de cette préparation, qui, en revanche, est inactive sur les glucides ne présentant pas la configuration β -galactosidique.
3. Les activités en lactose et en niphégal sont le fait d'un même enzyme, ainsi que le démontrent les résultats suivants :
4. La vitesse d'inactivation thermique est la même qu'on estime l'activité en présence de lactose ou de niphégal.
5. L'électrophorèse révèle la présence dans la préparation de deux constituants au moins. Chacune de ces deux fractions est active sur le lactose et sur le niphégal. Le rapport des activités est le même pour les deux fractions.
6. Un sérum précipitant anti-lactase a été obtenu par immunisation de lapins à l'aide de la préparation purifiée. L'étude quantitative de la réaction de précipitation indique que l'activité enzymatique estimée soit sur le lactose, soit sur le niphégal, est associée à un antigène unique. L'existence d'une protéine donnant une réaction croisée très marquée avec la galactosidase, mais dépourvue d'activité enzymatique a été démontrée.
7. L'action des ions sur l'hydrolyse enzymatique du lactose est étudiée. Les effets des cations monovalents sont particulièrement marqués et complexes, et tels que le même ion (sodium) peut, suivant les conditions (présence de certains autres cations) paraître exercer une action inhibitrice ou activatrice.
8. Ces effets résultent des relations compétitives existant entre les cations monovalents. Une interprétation est envisagée qui rendrait compte de ces phénomènes ainsi que des effets inhibiteurs de certains ions, en faisant intervenir seulement deux constantes caractéristiques, à savoir l'affinité (inverse de la constante de dissociation apparente du complexe ion-enzyme) et l'activance (activité de l'enzyme à saturation par l'ion).
9. Dans l'hydrolyse du lactose, l'ion présentant l'activance maximum est le potassium, tandis que le sodium n'active que faiblement. Au contraire, avec le niphégal comme substrat, l'activance du sodium est plus élevée que celle du potassium. Cette remarquable inversion des effets des ions démontre que l'activance est liée à la structure chimique du substrat.

SUMMARY

1. A method for the purification of the adaptive enzyme of *E. coli*, β -galactosidase (lactase) has been described.

* Le Dr Louis SIMINOVITCH, travaillant dans le laboratoire du Professeur TISELIUS, a tout récemment répété cette séparation sur une préparation d'enzyme obtenue dans des conditions très différentes. Ici encore les fractions ascendante et descendante présentaient les mêmes caractéristiques d'activité.

2. Lactose and *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside are quantitatively hydrolysed by this enzyme preparation which, however, is inactive on sugars not possessing the β -galactosidic configuration.

3. The following results (4, 5, and 6) indicate that the hydrolysis of lactose and *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside is catalyzed by the same enzyme.

4. The speed of thermal inactivation is the same whether one determines the activity with lactose or *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as substrate.

5. The electrophoretic analysis of this purified preparation reveals the presence of at least two constituents. Each of these electrophoretically distinct constituents is active on lactose and on *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, and the ratio of these activities is the same for both fractions.

6. A precipitating anti-lactase serum has been obtained by immunization of rabbits with the purified enzyme preparation. A quantitative study of the precipitin reaction indicates that the enzymatic activity, whether it be determined on lactose or *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, is associated with a single antigenic species. There has also been demonstrated the existence of a protein which possesses no enzymatic activity but which markedly crossreacts with the β -galactosidase.

7. The action of various ions on the enzymatic hydrolysis of lactose has been investigated. The effects of monovalent cations are particularly marked and complex. Depending upon the conditions (the presence of certain other cations), a given ion (sodium) is able to behave as either an inhibitor or an activator.

8. These effects are the result of the competitive relationship between the monovalent cations. In order to account for the above phenomena, a hypothesis is presented, bringing into play only two characteristic constants: the affinity (inverse of the apparent dissociation-constant of ion-enzyme complex) and the "activance" (activity of the enzyme when saturated by the ion).

9. For the hydrolysis of lactose, potassium shows the maximum "activance", while the sodium is only weakly active. On the other hand, with *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as substrate, the "activance" of sodium is higher than that of the potassium. This remarkable inversion of the effects of ions demonstrates that the activance is linked to the chemical structure of the substrate.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine Methode zur Reinigung der adaptiven β -Galaktosidase (Laktase) von *E. coli* wurde beschrieben.

2. Laktose und *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid ("Niphégal") werden in Gegenwart dieses Enzympräparates quantitativ hydrolysiert, während Zucker, die keine β -Galaktosid-Konfiguration aufweisen, nicht angegriffen werden.

3. Die folgenden Ergebnisse (siehe 4, 5 und 6) zeigen, dass die Hydrolyse von Laktose und *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid durch dasselbe Enzym katalysiert wird.

4. Die Wärme-Inaktivierung ist dieselbe, ob man nun die Aktivität mit Laktose oder mit *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid als Substrat bestimmt.

5. Die Elektrophorese dieses gereinigten Präparates lässt die Gegenwart mindestens zweier Bestandteile erkennen. Jede dieser beiden Fraktionen ist sowohl gegenüber Laktose als gegen *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid aktiv. Das Verhältnis der Aktivitäten ist für die beiden Fraktionen dasselbe.

6. Ein präzipitierendes anti-Laktaseserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit dem gereinigten Enzympräparat hergestellt. Die quantitative Untersuchung der Präzipitationsreaktion hat gezeigt, dass die Enzymaktivität, ob sie nun in Bezug auf Laktose oder *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid bestimmt wird, einem einzigen Antigen entspricht. Das Vorhandensein eines Eiweißstoffes, der starke Kreuzreaktionen mit der Galaktosidase zeigt, aber als Enzym inaktiv ist, wurde bewiesen.

7. Die Wirkung verschiedener Ionen auf die enzymatische Hydrolyse der Laktose wurde untersucht. Der Effekt der einwertigen Kationen ist besonders deutlich und komplex. Je nach den Umständen (Gegenwart gewisser anderer Kationen) scheint ein und dasselbe Kation (Natrium) hemmend oder aktivierend zu wirken.

8. Diese Effekte sind das Ergebnis der "Konkurrenz" zwischen den einwertigen Kationen. Eine Hypothese, welche die oben erwähnten Erscheinungen und die Hemmwirkung gewisser Ionen erklären könnte, wurde aufgestellt. Sie verwendet nur zwei charakteristische Konstanten, nämlich die Affinität (der umgekehrte Wert der scheinbaren Dissoziationskonstante des Komplexes Ion-Enzym) und die "activance" (Aktivität des Enzyms bei Sättigung durch das Ion).

9. Bei der Hydrolyse der Laktose zeigt Kalium die grösste "activance", während Natrium nur schwach aktiv ist. Mit *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid als Substrat ist dagegen die "activance" von Natrium grösser als die von Kalium. Diese merkwürdige Umkehrung in der Wirkung der Ionen beweist, dass die "activance" mit der chemischen Struktur des Substrates zusammenhängt.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. D. BOYER, H. A. LARDY ET P. H. PHILLIPS, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 673.
- 2 P. D. BOYER, H. A. LARDY ET P. H. PHILLIPS, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 529.
- 3 M. COHN ET A. M. JR. PAPPENHEIMER, *J. Immun.*, 63 (1949) 291.
- 4 M. COHN, L. R. WETTER ET H. F. DEUTSCH, *J. Immun.*, 61 (1949) 283.
- 5 C. E. COULTHARD, R. MICHAELIS, W. F. SHORT, G. SYKES, G. E. SKRIMSHIRE, A. F. STANDFAST, J. H. BIRKINSHAW ET H. RAISTRICK, *Biochem. J.*, 39 (1945) 24.
- 6 J. FREUND ET M. V. BONANTO, *J. Immun.*, 48 (1944) 325.
- 7 L. GORINI ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 524.
- 8 D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Biochem. J.*, 42 (1948 a) 221.
- 9 D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Biochem. J.*, 42 (1948 b) 230.
- 10 A. LWOFF ET H. IONESCO, *Ann. Inst. Pasteur*, 74 (1948) 442.
- 11 A. LWOFF ET H. IONESCO, *Ann. Inst. Pasteur*, 79 (1950) 14.
- 12 P. A. MACLEOD ET E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 170 (1947) 351.
- 13 P. A. MACLEOD ET E. E. SNELL, *J. Bact.*, 59 (1950) 783.
- 14 J. MONOD, Unités biologiques douées de continuité génétique. Edit. C.N.R.S., Paris 1949, 181.
- 15 J. MONOD, *Symp. Biochem. Society*, No. 4, 1950.
- 16 J. MONOD ET A. AUDUREAU, *Ann. Inst. Pasteur*, 72 (1946) 868.
- 17 J. MONOD ET A. M. TORRIANI, *Compt. rend.*, 227 (1948) 240.
- 18 J. MONOD, A. M. TORRIANI ET J. GRIBETZ, *Compt. rend.*, 227 (1948) 315.
- 19 P. G. PIGMAN, *Adv. Enzymology*, 1944. Interscience Publ. New York.
- 20 E. RACKER ET J. KRIMSKY, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 453.
- 21 L. RAPKINE, D. SHUGAR ET L. SIMINOVITCH, *J. chimie physique*, 4 (1949) 642.
- 22 M. SEIDMAN ET K. P. LINK, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4324.
- 23 SZENT-GYÖRGYI, Chemistry of muscular contraction. 1947. Academic Press Inc. New York.
- 24 M. F. UTTER, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 499.

Reçu le 2 décembre 1950

NOTE

Au moment d'envoyer ce travail à l'impression nous avons eu connaissance d'un mémoire de J. LEDERBERG (*J. Bact.*, Vol. 60, octobre 1950) sur la galactosidase produite par la souche "K 12" d'*E. coli*. Les intéressantes observations de LEDERBERG sur les effets des ions alcalins pourraient, au premier abord, apparaître assez divergentes des nôtres, mais le caractère préliminaire de cette publication et le fait que LEDERBERG a employé exclusivement le niphégal comme substrat tandis que nous avons surtout utilisé le lactose n'autorisent pas de comparaison détaillée entre ces résultats et les nôtres. Il y a tout lieu de croire qu'il s'agit du même enzyme.