

LE COMPORTEMENT DE LA PROTÉINASE*
ENDOCELLULAIRE DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*
AU COURS DE LA LYSE DE CET ORGANISME
PAR LE LYSOZYME

par

LUIGI GORINI ET MARC CREVIER

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

Les résultats obtenus dans des investigations antérieures^{1,2}, sur la fraction de la protéinase de *Micrococcus lysodeikticus* libérée dans le milieu au cours de la culture de ce microorganisme, nous ont conduits à étudier le comportement de la fraction endocellulaire de la protéinase au cours de la lyse des cellules de cette bactérie par le lysozyme. Nous avons pu ainsi constater que, au moment de la lyse des cellules, celles-ci ont en puissance la possibilité d'hydrolyser leurs protéines cellulaires; mais cette possibilité ne se manifeste que si l'on ajoute une certaine quantité de calcium au milieu contenant les bactéries lysées. Ce résultat confirme la conclusion d'un travail précédent³, à savoir que la synthèse, par la cellule, de la partie protéique de ce type de protéinase ne semble pas nécessiter la présence de calcium, mais que ce métal est indispensable à la stabilité et au fonctionnement de cet enzyme.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

La souche bactérienne utilisée, le milieu et les conditions de culture, ont été décrits précédemment^{1,2}: *M. lysodeikticus* cultivé sur bouillon gélosé contenant 0.8% de glucose, incubation à 26° pendant 4 jours, pH de la culture à la fin de l'incubation 7.5. On récolte les bactéries en les entraînant par lavage avec une solution de NaCl 0.9%. On les sépare par centrifugation, on les lave deux fois avec la solution de NaCl et une dernière fois avec une solution de véronal tampon⁴ à pH 7.5. Après la dernière centrifugation, on met en suspension les bactéries lavées dans la même solution de véronal tampon. Cette suspension est utilisée tout de suite, les bactéries étant encore vivantes. C'est sur cette suspension que l'on fait agir une solution de lysozyme cristallisé "Armour" à la concentration de 1 mg/100 ml. La lyse se fait à pH 7.5 et à 26°. L'étude de la protéolyse est faite en dosant l'azote aminé libéré selon la méthode de VAN SLYKE ET NEILL⁵.

I. Répartition de l'azote aminé au cours de la lyse de la suspension bactérienne

Nous avons suivi la lyse d'une suspension bactérienne traitée par le lysozyme, en faisant des déterminations d'azote total et d'azote aminé dans le culot et dans le liquide surnageant qu'on obtient par centrifugation d'échantillons prélevés de temps en temps du milieu réactionnel.

* Ce terme est employé ici au sens général; il n'implique en rien qu'il s'agisse d'un seul enzyme protéolytique.

Bibliographie p. 294.

L'azote total est déterminé par analyse, selon KJELDAHL, des bactéries lavées à l'eau distillée et séchées à l'acétone. La quantité maximum d'azote aminé qui eût pu apparaître au cas où la totalité des protéines présentes eût été hydrolysée, est déterminée par la méthode de VAN SLYKE sur l'hydrolysât obtenu à partir des bactéries séchées à l'acétone, en traitant une quantité donnée, à 110° pendant 24 heures, par HCl 6 N, en tube scellé, sous vide.

Le Tableau I indique les quantités d'azote total, d'azote aminé total après hydrolyse acide, d'azote aminé libre avant et après la lyse, existant dans une suspension bactérienne en solution tampon phosphate à p_H 6.4, contenant 9 mg/ml de bactéries et traitée par le lysozyme à 30°. Après 30 minutes de lyse, 64% de l'azote aminé libre des bactéries sont passés dans le liquide surnageant; après 150 minutes, cette quantité a atteint 76%, mais il n'apparaît aucune augmentation de l'azote aminé libre total.

TABLEAU I
RÉPARTITION DE L'AZOTE AMINÉ AU COURS DE LA LYSE DE LA SUSPENSION BACTÉRIENNE

Durée de la lyse (minutes)	% N aminé libre			% N total d'après KJELDAHL	% N aminé total (hydrolyse acide)
	Culot	Liquide surnageant	Total		
0	1.20	0.05	1.25	9.5	6.75
30	0.45	0.82	1.27		
150	0.30	0.95	1.25		

On voit ainsi que l'azote aminé libre préexistant passe de plus en plus du culot au liquide surnageant, au fur et à mesure que l'action du lysozyme progresse; mais dans aucun cas, on n'observe une augmentation de l'azote aminé libre global. Un certain nombre d'expériences ont été faites à différentes températures entre 26° et 37°, en présence de différents tampons (phosphate, borate, véronal), à différents p_H compris entre 6 et 8, ou en présence de H_2S M/100, mais dans aucune de ces conditions on n'a jamais constaté d'augmentation sensible de l'azote aminé libre total par rapport à celui qui existait avant la lyse, même en prolongeant l'opération pendant plusieurs jours.

II. La protéolyse pendant la lyse de la suspension bactérienne

Le Tableau II indique l'augmentation de l'azote aminé libre total, pendant la lyse de deux essais parallèles, l'un en présence de NaCl et l'autre de $CaCl_2$. Il apparaît une différence nette entre l'essai conduit en présence de sodium et celui en présence de calcium.

TABLEAU II
AUGMENTATION DE L'AZOTE AMINÉ LIBRE PENDANT LA LYSE EN PRÉSENCE DE CALCIUM

Tampon véronal dilué à 50%; bactéries lavées 6.5 mg/ml; NaCl M/20 ou $CaCl_2$ M/35; lysozyme 10 µg/ml; toluène 1%.

La lyse est faite à 26° et à p_H 7.5.

Les résultats sont exprimés en µg d'azote aminé libre par 10 mg de bactéries.

Durée de la lyse	En présence de NaCl	En présence de $CaCl_2$
24 heures	0	17
3 jours	4	27
10 jours	54	200

Afin de pouvoir conclure dans le sens d'une véritable activation des protéinases par le calcium, il fallait encore démontrer que celui-ci n'agit en aucune façon, dans nos conditions expérimentales, sur les protéines cellulaires qui servent de substratum, en les rendant plus sensibles à l'action de l'enzyme; cette démonstration résulte de ce que (Tableau III) la protéolyse a lieu, même si la lyse est faite sans aucune addition de calcium, lorsqu'on ajoute au milieu une quantité suffisante de protéinase active. L'expérience est faite en utilisant comme enzyme actif la protéinase du milieu de culture de *M. lysodeikticus* après dialyse³.

TABLEAU III

PROTÉOLYSE DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR LA PROTÉINASE DE *M. lysodeikticus*

Solution de protéinase (ou tampon véronal pour le témoin) 5 ml; suspension des bactéries (8 mg/ml) dans le tampon véronal 5 ml; lysozyme 10 µg/ml; toluène 1%.

Lyse faite à 26°; azote aminé libéré calculé par différence entre l'azote aminé libre total après 2 heures et au temps zéro. Prises d'essai correspondant à 1 ml de solution de protéinase.

Résultats exprimés en µg N aminé par heure et par 0.5 ml de bactéries.

	Sur les bactéries (10 mg)	Sur gélatine (45 mg)
Sans protéinase	0	0
Protéinase	19	46
Protéinase inactivée	2	0

Le Tableau III donne également à titre de contrôle, les valeurs obtenues, dans des conditions tout à fait comparables, lorsqu'un volume de la solution de protéinase utilisée agit sur un volume égal d'une solution de gélatine à 7% en tampon borate. L'essai réalisé avec les protéinases inactivées (inactivation obtenue en maintenant l'enzyme 24 heures à 37° et à pH 5)³, est indispensable pour montrer que la solution de protéinase n'est pas elle-même un substrat pour l'action des peptidases*, toujours contenues à l'état actif dans le lysat des cellules de *M. lysodeikticus*. Remarquons à ce point de vue que la dialyse a éliminé ici tous les peptides courts, qui auraient pu être attaqués par les peptidases des bactéries lysées.

DISCUSSION

L'examen des résultats obtenus montre que la lyse des cellules de *M. lysodeikticus* par le lysozyme n'est accompagnée d'une protéolyse que dans le cas où l'on ajoute à la suspension bactérienne soit du calcium, soit une solution de protéinase déjà active. On peut en conclure d'une part que dans les conditions d'expérience réalisées ici, les protéines cellulaires peuvent être attaquées directement par les protéinases bactériennes, d'autre part que les cellules soumises à la lyse contiennent une quantité d'enzyme suffisante pour exercer une action protéolytique nette sur les protéines cellulaires, mais que cet enzyme ne peut pas fonctionner si l'on n'ajoute pas du calcium au milieu.

Il convient de remarquer que la culture est faite ici dans un milieu qui contient naturellement du calcium à la concentration d'environ $M/300$. Il est donc vraisemblable que les cellules contiennent une quantité de calcium qui serait suffisante pour permettre le fonctionnement des protéinases, si ces protéinases étaient les seules substances contenant du calcium. Mais le calcium se répartit entre diverses autres substances, de sorte qu'il est finalement en quantité trop faible pour permettre le fonctionnement des

* L'étude des peptidases de *M. lysodeikticus* est actuellement en cours.

enzymes en question. Ces résultats apportent une preuve de plus que le calcium est nécessaire à la stabilité et au fonctionnement des protéinases bactériennes, plutôt qu'à leur synthèse par les cellules bactériennes, comme il a été démontré antérieurement³.

Il n'est pas sans intérêt de rapprocher ces résultats de ceux de HULTIN⁶ qui a observé que dans les homogénates d'œufs d'oursins, l'addition de calcium produit des transformations dont l'auteur se demande si elles ne correspondent pas à une protéolyse.

RÉSUMÉ

La lyse des cellules de *M. lysodeikticus* par le lysozyme n'est accompagnée d'une protéolyse que si l'on ajoute au milieu lysé une certaine quantité de calcium. Ce fait montre que, au moment de la lyse des cellules, celles-ci ont en puissance les protéinases nécessaires à l'hydrolyse des protéines cellulaires; il apporte une confirmation à la conclusion que le calcium, nécessaire à la stabilité et au fonctionnement de ce genre de protéinase, ne l'est pas à la synthèse de la partie protéique de la molécule.

SUMMARY

Lysis of the cells of *M. lysodeikticus* by lysozyme is only accompanied by proteolysis if a certain amount of calcium is added to the medium. This fact shows that, at the moment of lysis of the cells, they contain potentially the proteinases necessary for the hydrolysis of the cell proteins. It confirms the conclusion that calcium, which is essential for the stability and for the functioning of this type of proteinase, is not necessary for the synthesis of the protein part of its molecule.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Lyse der Zellen von *M. lysodeikticus* durch das Lysozym ist nur dann von einer Proteolyse begleitet, wenn man dem Milieu eine gewisse Menge Calcium zufügt. Diese Tatsache zeigt, dass die Zellen im Augenblick der Lyse die zur Hydrolyse der Zellproteine erforderlichen Proteinase in inaktiver Form enthalten; hiermit wird die Folgerung bestätigt, dass das Calcium, welches für die Beständigkeit und Funktion dieser Art von Proteinase notwendig ist, für die Synthese des Proteinanteils des Proteinase-moleküls jedoch nicht notwendig ist.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ L. GORINI ET C. FROMAGEOT, *Compt. rend.*, 229 (1949) 559.
- ² L. GORINI ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 524.
- ³ L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 237.
- ⁴ L. MICHAELIS, *Biochem. Z.*, 234 (1931) 139.
- ⁵ D. VAN SLYKE ET J. NEILL, *J. Biol. Chem.*, 61 (1924) 523;
D. VAN SLYKE, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 425.
- ⁶ T. HULTIN, *Exper. Cell. Research*, 1 (1950) 272.

Reçu le 18 décembre 1950