

ÉTUDE PAR LA DIFFUSION DES RAYONS X DES MODIFICATIONS SUBIES PAR CERTAINES PROTÉINES

par

D. G. DERVICHIAN, G. FOURNET ET A. GUINIER

Institut Pasteur et Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris (France)

Dans des publications antérieures^{1, 2} nous avons rendu compte des résultats obtenus par la méthode de la diffusion des rayons X dans l'étude de la taille des molécules de protéines en solution aqueuse. Dans le présent travail nous avons voulu suivre, d'une part, les modifications de la taille des particules sous l'action de l'urée et, d'autre part, l'influence des ions métalliques sur l'association de ces molécules. Nous avons remarqué dans un travail précédent que l'addition de 25 % d'urée à une solution d'hémoglobine ou d'hémocyanine ne produisait pas de modification appréciable dans la taille des particules au bout de plusieurs heures. Nous avons repris cette étude en présence de quantités plus importantes d'urée et en faisant varier la durée du contact entre la protéine et l'urée. Cette étude a été étendue à la sérum albumine de cheval. Les expériences ont été faites à la température du laboratoire (18° à 22°).

Le pouvoir diffusant de la sérum albumine est très inférieur à celui de l'hémoglobine. On pourrait probablement attribuer cette différence à la présence des atomes de fer dans l'hémoglobine. Nous avons eu comme hypothèse de travail de fixer du cuivre sur la sérum albumine afin d'intensifier les diagrammes de diffusion obtenus avec cette protéine. Ceci nous a conduit à constater l'association de particules de sérum albumine en présence du sel de cuivre.

ACTION DE L'URÉE

Il est généralement admis que l'urée a une action dénaturante sur les protéines en solution. Les auteurs qui ont étudié cette action par des mesures osmotiques^{3, 4} sont arrivés à la conclusion que, pour certaines protéines et en particulier l'hémoglobine, la molécule se trouvait dissociée en particules deux fois plus petites en poids moléculaire et que, par contre, la sérum albumine ne subissait pas de changement. Par des mesures de diffusion et de viscosité effectuées sur des solutions de sérum albumine en présence de 6.66 *M* ou 8 *M* d'urée, d'autres auteurs^{5, 6} sont arrivés à la conclusion que la particule de sérum albumine devenait fortement dissymétrique.

Ainsi que nous le montrons dans le présent travail, en présence de certaines concentrations d'urée et au bout d'un certain temps, dépendant de la quantité relative d'urée et de protéine, la diffusion, par la solution, des rayons X aux petits angles, non seulement diminue d'intensité, mais ne présente plus la forme de décroissance de l'intensité correspondante aux particules initiales. Dans beaucoup de cas, la courbe représentant l'intensité de diffusion en fonction de l'angle est à peu près analogue à celle que donne

l'eau pure. C'est seulement dans ce sens que nous disons que la protéine est dissociée par une certaine concentration d'urée au bout d'un temps donné, sans préjuger de la modification ou de la "dénaturation" subie par les molécules: déroulement, scission, etc.

a. *Hémoglobine de Cheval*

Nous avons constaté^{1, 2} que l'addition de 25 % d'urée à une solution contenant de 3 à 12 % d'hémoglobine ne donnait pas lieu à une modification de la courbe d'intensité de diffusion après plusieurs heures de contact. Ce résultat semblait en contradiction avec les faits observés par STEINHARDT⁸. Cet auteur a en effet constaté par des mesures de constantes de sédimentation que les concentrations d'urée du même ordre de grandeur dissociaient les molécules d'hémoglobine. Pour expliquer cette contradiction nous avons attiré l'attention sur le fait que les solutions étudiées par STEINHARDT ne contenaient que 0.43 à 0.65 % d'hémoglobine et que probablement les quantités relatives d'urée par rapport à la quantité de protéine pouvaient avoir une importance. Nous avons donc fait varier aussi bien la concentration en hémoglobine que celle en urée, et nous avons examiné les effets produits pour des temps variant entre quelques heures et plusieurs jours.

Avec une solution à 4 % d'hémoglobine, à laquelle on a ajouté 25 % en poids d'urée et au bout de 4 heures de contact, le rayon de giration* trouvé est de 23.5 Å, égal à celui donné par une solution d'hémoglobine en l'absence d'urée. Au bout de 24 heures de contact, le même système montre que les molécules d'hémoglobine sont dissociées: la diffusion est à peu près analogue à celle donnée par l'eau pure. Avec une solution à 12 % d'hémoglobine, l'addition de 25 % en poids d'urée ne produit pas de modification au bout de 4 heures ni même au bout de 24 heures. Au bout de 24 heures le diagramme est à peu près identique au précédent et permet de mesurer un rayon de 22.5 Å, (la méthode n'est pas assez précise pour que l'on puisse attribuer une signification à cette différence de 1 Å). Par contre, le même système apparaît comme complètement dissocié au bout de 48 heures de contact.

Ainsi une même concentration d'urée (25 %) dissocie l'hémoglobine d'autant plus lentement que celle-ci est plus concentrée. La contradiction apparente avec les résultats obtenus par STEINHARDT se trouve donc ainsi expliquée dans le sens que nous avons prévu, c'est à dire que 25 % d'urée suffisent à dissocier en quelques heures l'hémoglobine à des concentrations inférieures à 1 %, mais ne suffisent pas lorsque la solution contient 4 % et davantage d'hémoglobine. Nous avons également observé que si une solution à 4 % d'hémoglobine n'est pas encore dissociée au bout de 4 heures par 25 % d'urée, avec 30 % d'urée une solution à 4 % d'hémoglobine présente déjà au bout de 3 heures de contact une courbe de diffusion à peu près analogue à celle de l'eau pure: les molécules sont dissociées. De même avec une solution à 12 % d'hémoglobine, il y a dissociation complète après 6 heures de contact lorsque la quantité d'urée est de 33 %.

b. *Hémocyanine d'Escargot*

Aussi bien les études de KRATKY⁸ que les nôtres² avaient montré l'existence d'un accident dans la courbe d'intensité de la diffusion en fonction de l'angle. Si la loi de BRAGG était applicable, cet accident correspondrait d'après nos mesures à une période de 220 Å (KRATKY donne 260 Å). Nous avons constaté que la place de cet accident ne se trouvait pas modifiée par la dilution de la solution d'hémocyanine et nous en avons

* Rappelons que le rayon de giration ρ représente le rayon d'une particule ayant le même moment d'inertie que la particule étudiée mais dont la masse serait entièrement localisée à la distance ρ du centre de rotation. Il se définit de la même façon que dans le calcul des moments d'inertie⁹.

déduit que la périodicité observée devait être intra-particulaire et ne devait pas correspondre à la distance entre particules dissoutes. En effet s'il en était ainsi l'intervalle devrait varier avec la dilution. L'étude des modifications subies par l'hémocyanine sous l'action de l'urée est rendue difficile par la petitesse du domaine angulaire qu'il convient d'explorer du fait que la période observée est très grande. On peut néanmoins donner les indications suivantes. Avec 25% d'urée, l'hémocyanine n'est dissociée qu'en partie au bout de 24 heures. Avec 33% d'urée, l'hémocyanine n'est qu'en partie dissociée au bout de quelques heures. Il y a en tout cas dissociation complète avec 40% d'urée au bout de 4 jours.

c. *Sérum Albumine de Cheval*

La sérum albumine a été préparée par trois cristallisations successives en présence de SO_4Am_2 et en amenant au point isoélectrique par addition de SO_4H_2 . La solution est ensuite dialysée pour éliminer le sel. Une solution à 14% de protéine mise en contact avec de l'urée à différentes concentrations a été examinée au bout de quelques heures (3 à 4 h). Il y a dissociation au bout de quelques heures aussi bien avec 20, 25, 35 que 44% d'urée. On a examiné en même temps une solution témoin ne contenant pas d'urée, et un échantillon contenant de l'eau pure; on a pu ainsi tenir compte des diffusions parasites. On constate après correction que les courbes de diffusion sont à peu près identiques à celles du témoin (solution d'albumine sans urée), mais que les rapports entre l'intensité du rayonnement diffusé et l'intensité du faisceau direct sont différents. On peut interpréter ce fait en admettant, qu'à la suite du contact avec l'urée, le système est formé d'un mélange de particules normales, et de petites particules, seules les grosses produisant une diffusion appréciable. Dans ces conditions, on peut dire quantitativement qu'après contact de quelques heures, avec 20% d'urée, 65% des molécules d'albumine sont dissociées, avec 44% d'urée plus de 80% des molécules sont dissociées.

Nous avons vu que la dissociation de l'hémoglobine et de l'hémocyanine ne se produisait au bout de quelques heures qu'avec des concentrations plus grandes en urée que dans le cas de la sérum albumine. On peut donc dire que, du point de vue de l'action de l'urée, la sérum albumine est moins stable que l'hémoglobine et l'hémocyanine.

ACTION DU CUIVRE

A une solution à 2% en sérum albumine a été ajouté de l'hydroxyde de cuivre. Après 24 heures de contact l'ensemble est amené à pH 7, puis centrifugé afin d'éliminer l'excès d'hydroxyde de cuivre. Cette solution colorée par le cuivre a été concentrée par évaporation dans un courant d'air et amenée à 15% en protéine. Pour cela le liquide est placé dans un manchon en cellophane pour dialyse maintenu dans un courant d'air. L'ensemble est disposé sur un agitateur animé d'un mouvement de bascule. C'est la solution concentrée qui a été examinée aux rayons X. Le diagramme obtenu est comparé à celui d'une solution de sérum albumine amené à la même concentration de 15% et n'ayant pas subi l'action du cuivre.

Nous avons constaté que l'intensité globale du rayonnement diffusé n'a pas changé par rapport au témoin mais que la forme de la courbe d'intensité de diffusion en fonction de l'angle est modifiée comme si elle correspondait à de plus grosses particules. Si l'on trace la courbe du logarithme de l'intensité en fonction du carré de l'angle de diffusion⁹ on constate que cette courbe est formée de deux parties rectilignes à pentes différentes.

Bibliographie p. 149.

TABLEAU I

RELATIONS ENTRE LA CONCENTRATION EN PROTÉINES, LA CONCENTRATION EN URÉE,
LE TEMPS DE CONTACT ET LA DISSOCIATION

1. Hémoglobine de Cheval			
4% Hémoglobine	+ 25% urée	4 heures de contact	non dissociée
4% Hémoglobine	+ 25% urée	24 heures de contact	dissociée
4% Héoglobine	+ 30% urée	3 heures de contact	dissociée
12% Hémoglobine	+ 25% urée	4 heures de contact	non dissociée
12% Hémoglobine	+ 25% urée	24 heures de contact	non dissociée
12% Hémoglobine	+ 25% urée	48 heures de contact	complètement dissociée
12% Hémoglobine	+ 33% urée	6 heures de contact	complètement dissociée
2. Hémocyanine d'Escargot			
1% Hémocyanine	+ 25% urée	4 heures de contact	non dissociée
1% Hémocyanine	+ 25% urée	24 heures de contact	en partie dissociée
1% Hémocyanine	+ 33% urée	4 heures de contact	en partie dissociée
1% Hémocyanine	+ 40% urée	48 heures de contact	complètement dissociée
3. Sérum Albumine de Cheval			
10% Sérum Albumine	+ 20% urée	18 heures de contact	complètement dissociée
10% Sérum Albumine	+ 25% urée	18 heures de contact	complètement dissociée
10% Sérum Albumine	+ 35% urée	18 heures de contact	complètement dissociée
14% Sérum Albumine	+ 20% urée	3 heures de contact	65% (?) dissociée
14.5% Sérum Albumine	+ 25% urée	4 heures de contact	dissociée
14.5% Sérum Albumine	+ 35% urée	4 heures de contact	dissociée
14% Sérum Albumine	+ 44% urée	3 heures de contact	80% (?) dissociée

Tout semble se passer comme s'il existait dans la solution un mélange de deux sortes de particules ayant chacune un rayon de giration différent. A l'un des segments de droite correspond un rayon de giration de 25 Å, et à l'autre un rayon de giration de 40 Å. La valeur de 25 Å se confond, aux erreurs d'expérience près, avec ce que l'on trouve avec la solution de sérum albumine témoin n'ayant pas subi l'influence du cuivre. Il y aurait donc dans la solution d'une part des molécules d'albumine non modifiées et d'autre part des particules plus grosses formées peut-être par l'association d'un certain nombre des premières liées entre elles par des "ponts" cuivriques. On peut dès lors se demander combien de particules élémentaires sont associées pour pouvoir donner un rayon de giration de 40 Å.

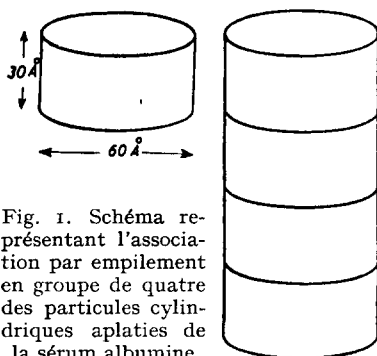


Fig. 1. Schéma représentant l'association par empilement en groupe de quatre des particules cylindriques aplaties de la sérum albumine

L'un de nous¹⁰ avait suggéré que les particules d'hémocyanine étaient formées par l'empilement de micelles plates élémentaires accolées par leur faces planes et que la dissociation de l'hémocyanine consistait dans la séparation de ces disques superposés. La liaison entre ces différents disques serait assurée par le groupe contenant le cuivre de l'hémocyanine. Inversement pour interpréter les résultats obtenus en faisant agir l'hydroxyde de cuivre sur la sérum albumine on pourrait supposer que les particules cylindriques plates de la sérum albumine se trouvent

accolées par leur faces planes grâce à la présence des atomes de cuivre, donnant ainsi des espèces de pile de molécules élémentaires.

Si donc l'on suppose que les particules normales de sérum albumine ont une forme cylindrique aplatie, le rayon de giration trouvé de 23 Å, compte tenu du poids moléculaire et de la densité, conduit aux dimensions suivantes: 30 Å de hauteur pour 60 Å de diamètre. On peut alors calculer le rayon de giration correspondant soit à 3 soit à 4 ou 5 de ces cylindres empilés les uns sur les autres et accolés par leur faces planes (voir figure). On trouve qu'à trois cylindres empilés, correspond un rayon de giration de 33.5 Å, à quatre cylindres superposés correspond un rayon de giration de 40.5 Å et à cinq, 48 Å.

Tout ce que l'on peut donc dire, à partir de la valeur de 40 Å déduite des mesures, c'est que le nombre de particules associées est de l'ordre de quatre, à supposer que les particules sont bien associées par un tel empilement. Quel que soit d'ailleurs le mode d'association, la valeur de 40 Å semble indiquer que le nombre de particules associées est voisin de 4.

RÉSUMÉ

1. *Modifications dues à l'urée.* L'action de l'urée sur l'hémoglobine, l'hémocyanine et la sérum albumine a été étudiée en examinant par la diffusion des rayons X la variation de la taille des particules de protéines. Le temps nécessaire à la dissociation dépend non seulement de la concentration en urée mais aussi des quantités relatives d'urée et de protéine présentes dans la solution. Du point de vue de l'action de l'urée, la sérum albumine est moins stable que l'hémoglobine et l'hémocyanine.

2. *Modifications dues au cuivre.* L'addition d'hydroxyde de cuivre à une solution de sérum albumine fait apparaître, à côté des particules ordinaires de la sérum albumine, des particules plus grosses qui proviendraient de l'association des particules élémentaires en groupe de quatre.

SUMMARY

1. *Changes due to urea.* The action of urea on haemoglobin, haemocyanin, and serum albumin has been followed by examining the variation in size of the particles by the method of low angle X-Ray scattering. The time required for dissociation depends not only upon the concentration of urea, but also upon the relative quantities of urea and protein present in the solution. As far as the action of urea is concerned, serum albumin is less stable than haemoglobin and haemocyanin.

2. *Changes due to copper.* Addition of copper hydroxide to a solution of serum albumin, causes the appearance of large particles, in addition to the ordinary serum albumin particles. These large particles seem to arise from the association of the elementary particles in groups of four.

ZUSAMMENFASSUNG

1. *Durch Harnstoff verursachte Veränderungen.* Die Wirkung des Harnstoffs auf Hämoglobin, Hämocyanin und Serumalbumin wurde durch Beobachtung von Grössenveränderungen der Proteinpartikeln mittels Kleinwinkelstreuung von Röntgenstrahlen untersucht. Die Dissoziationszeit ist nicht nur von der Harnstoffkonzentration, sondern auch von dem Verhältnis der Harnstoffmenge zur Proteinmenge abhängig. Was die Wirkung des Harnstoffs anbelangt, ist Serumalbumin weniger beständig als Hämoglobin und Hämocyanin.

2. *Durch Kupfer verursachte Veränderungen.* Der Zusatz von Kupferhydroxyd zu einer Serumalbuminlösung bringt neben gewöhnlichen Serumalbuminmolekeln grössere Partikeln zur Erscheinung, die wahrscheinlich von der Vereinigung von vier der Elementarmolekeln herrühren.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. G. DERVICHIAN, G. FOURNET ET A. GUINIER (Conférence Cambridge juin, 1948) in *Haemoglobin*, Butterworths Scientific Publications, London 1949, p. 131.
- ² D. G. DERVICHIAN, G. FOURNET ET A. GUINIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 101.
- ³ N. F. BURK ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 87 (1930) 197.
- ⁴ N. F. BURK, *J. Biol. Chem.*, 98 (1932) 353.
- ⁵ H. NEURATH ET A. M. SAUM, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 347.
- ⁶ H. NEURATH, G. R. COOPER ET J. O. ERICKSON, *J. Biol. Chem.*, 142 (1942) 249 et 264.
- ⁷ J. STEINHARDT, *J. Biol. Chem.*, 123 (1938) 543.
- ⁸ O. KRATKY, *J. Polymer Sci.*, 3 (1948), 195.
- ⁹ A. GUINIER, *Ann. phys.*, 12 (1939) 161.
- ¹⁰ D. G. DERVICHIAN, *J. chim. phys.*, 38 (1941) 59.

Reçu le 27 avril 1951