

## ACTION DE QUELQUES MÉTAUX BIVALENTS SUR LA SENSIBILITÉ DE LA SÉRUMALBUMINE À L'ACTION DE LA TRYPSINE

par

LUIGI GORINI ET LUCIENNE AUDRAIN

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

Dans un travail précédent<sup>1</sup>, étudiant le rôle joué par le calcium dans l'action protéolytique de la trypsine, nous avons montré que ce métal donne lieu à une activation apparente parce qu'il protège l'enzyme contre l'inactivation. Le manganèse a le même effet. BIER ET NORD<sup>2</sup> et BENTLEY<sup>3</sup> sont arrivés indépendamment aux mêmes conclusions. Nous avons montré également que cet effet de protection n'est pas limité à la trypsine. Il se manifeste aussi pour le substrat sur lequel nous avons étudié l'action de la trypsine, la sérumalbumine. Cette dernière est protégée par le calcium et le manganèse contre l'effet dû à une élévation de température, qui augmente la sensibilité de cette protéine à l'action protéolytique de la trypsine.

La suite des recherches a montré que la présence de certains métaux, et notamment du manganèse et du calcium, change toujours la sensibilité de la sérumalbumine à la trypsine, qu'il s'agisse de la sérumalbumine ordinaire (fraction V selon COHN ET EDSALL, du plasma de boeuf) ou de celle traitée pendant 30 minutes à 127° à l'autoclave. Du fait de cette action portant à la fois sur l'enzyme et sur le substrat, le métal contrôle le cours de la protéolyse mais il n'a le rôle ni d'un coenzyme ni d'un trait d'union assurant la formation du complexe enzyme-substrat.

Le présent travail est consacré à l'étude de l'action de certains métaux bivalents et de la complexone,\* sur la sensibilité, à l'action de la trypsine, de la sérumalbumine différemment traitée.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Techniques.* La disposition générale des expériences est la même que précédemment<sup>1</sup>. La sérumalbumine, fraction V du plasma de boeuf (Armour), est employée soit telle quelle ("sérumalbumine ordinaire"\*\*\*), soit après chauffage de sa solution (à 2.4%) dans du tampon borate à pH 7.9 à 100° pendant 20 minutes, puis à 127° pendant 30 minutes; cette dernière constitue la solution mère que nous avons employée comme "sérumalbumine dénaturée standard".

La trypsine\*\*\* à 4000 µg/ml dans l'eau bidistillée (il s'agit de la quantité réelle d'enzyme qui correspond à la moitié du poids pesé), est dialysée pendant 24 heures à 0° contre de l'eau bidistillée et constitue la solution mère de trypsine qu'on peut conserver à 0° pendant deux ou trois jours. L'enzyme dialysé dans ces conditions perd 15% de son activité de départ.

Les solutions mères des sels métalliques et de complexone, sont des solutions M/1 dans du tampon borate ( $5 \cdot 10^{-2}$  M), pH 7.9 des chlorures de Ca, Ba, Sr, Co, des sulfates de Mn et de Mg, et du sel de Na de la complexone. Elles sont généralement employées à une concentration 100 fois plus grande que celle qu'on veut obtenir, afin que leur addition (1/100 du volume total de l'essai) ne produise qu'une dilution négligeable. Dans des cas spéciaux, lorsque la concentration en métal dans l'essai est supérieure à  $10^{-2}$  M, on se sert de solutions mères plus concentrées, et on opère de façon à ne pas changer le volume final de l'essai.

\* Acide diéthylènediaminotétracétique (SIEGFRIED-ZOOFINGEN).

\*\* Et non pas "native" comme on l'avait improprement appelée dans un travail précédent<sup>1</sup>.

\*\*\* Cristallisée (Worthington-Freehold, N.J.) contenant 50% de  $\text{SO}_4\text{Mg}$ .

Toutes les solutions et les dilutions sont faites avec une solution tampon borate à pH 7.9 d'après CLARK ET LUBBS<sup>4</sup>. Les conditions générales de protéolyse sont les suivantes: solution de sérumalbumine à la dilution voulue, 5 ml; solution de trypsine à la dilution convenable, 1 ml; pH 7.9; présence ou absence de métal. Les concentrations de la sérumalbumine et les molarités des métaux indiquées, sont les concentrations finales réalisées dans l'essai de protéolyse. Les concentrations de trypsine indiquées sont celles de la solution d'enzyme employée. L'action enzymatique est arrêtée par 10 ml d'acide trichloracétique à 5%. La détermination du degré de protéolyse est faite par la méthode de ANSON<sup>5</sup> à l'aide d'un spectrophotomètre de Beckman ( $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ ). La température de la protéolyse est 25°, sauf indication contraire. A cette température, avec une solution de trypsine à 200  $\mu\text{g/ml}$  et une concentration de sérumalbumine dénaturée standard de 2%, l'accroissement du coefficient d'extinction est uniforme pendant les premières 10 minutes d'action. Après 10 minutes, il atteint la valeur de 0.270 et correspond à 2.5  $\mu\text{g}$  d'azote aminé libéré par mg de sérumalbumine employée (VAN SLYKE). La quantité de substrat hydrolysé représente alors 9% du poids de sérumalbumine employée (KJELDAHL).

#### *Action des ions métalliques sur la protéolyse de la sérumalbumine dénaturée standard*

Etant donné que les ions métalliques étudiés exercent une action non seulement sur la protéine qui constitue le substrat, mais aussi sur celle qui constitue l'enzyme, on doit étudier leur action dans deux conditions différentes. Dans un cas, le substrat, en faible

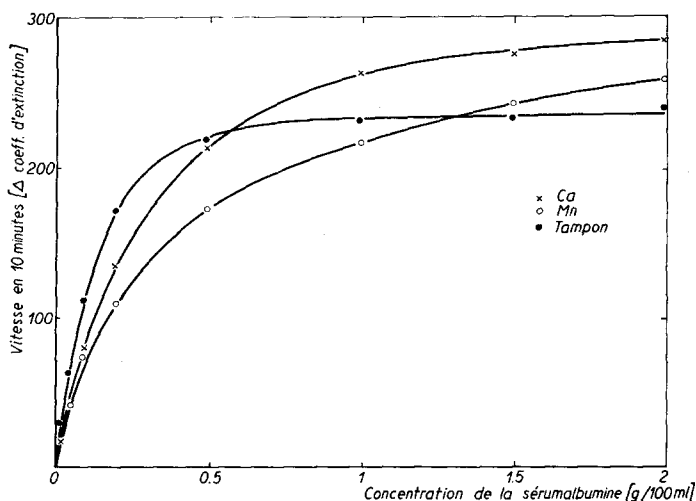


Fig. 1. Vitesse de protéolyse en fonction de la concentration de la sérumalbumine dénaturée standard. Trypsine 200  $\mu\text{g/ml}$

concentration par rapport à l'enzyme, est en quantité limitante; dans un autre cas le substrat, en forte concentration par rapport à l'enzyme, est en quantité saturante. Dans le premier cas, il est possible de mettre en évidence l'action de l'ion métallique sur le substrat, l'enzyme étant suffisamment en excès pour que les différences dans la quantité de sa forme active provoquées par la présence ou l'absence du métal, n'aient pas d'influence sur le cours de la réaction enzymatique. Dans le deuxième cas, la situation est renversée et l'excès de substrat doit permettre aux variations qui surviennent dans la quantité d'enzyme actif de devenir évidentes, sous réserve des précisions qu'on donnera plus loin.

La Fig. 1 donne une vue d'ensemble sur l'allure de la protéolyse en l'absence ou en présence de calcium ou de manganèse ( $10^{-2} \text{ M}$ ) lorsque les rapports quantitatifs enzyme-substrat changent. Les vitesses de protéolyse obtenues par une quantité de trypsine de

200  $\mu\text{g/ml}$  sont exprimées en fonction de la concentration de sérumalbumine dénaturée standard employée.

Tout d'abord, on doit remarquer que la courbe représentative de la protéolyse faite avec tampon seul doit être considérée réellement comme une courbe de saturation de l'enzyme par le substrat. En effet, si dans la protéolyse de la sérumalbumine à 2% on augmente la quantité d'enzyme (250  $\mu\text{g/ml}$  au lieu de 200), on obtient une valeur de protéolyse plus grande, qui correspond exactement à la valeur calculée d'après le chiffre d'expérience de l'essai: substrat 2% enzyme 200  $\mu\text{g/ml}$ .

D'autre part, les courbes de la Fig. 1 s'entre-croisent: lorsque le substrat est en quantité limitante, les vitesses de protéolyse varient dans l'ordre suivant: tampon seul  $> \text{Ca} > \text{Mn}$ . Il apparaît ainsi que le calcium, et plus encore le manganèse, diminuent la sensibilité à la trypsine de la sérumalbumine dénaturée standard. Lorsque c'est la trypsine qui est en quantité limitante, l'ordre des mêmes vitesses devient:  $\text{Ca} > \text{Mn} >$  tampon seul. Puisque l'on sait<sup>1</sup> que la quantité de trypsine active est augmentée du fait de la présence de calcium ou de manganèse, ces résultats doivent, en partie au moins, être l'expression de l'action de ces métaux sur l'enzyme. Mais l'allure particulière des courbes correspondant aux expériences faites en présence de métal, dépend également d'autres faits qu'il conviendra mieux de préciser après la discussion des résultats des expériences se référant aux figures 2 et 3.

L'influence des différents métaux a été étudiée en choisissant, d'après les indications fournies par la Fig. 1, des rapports substrat/enzyme tels qu'on réalise les deux conditions de substrat limitant et de substrat saturant. Les essais dans lesquels le substrat est en quantité limitante contiennent une concentration de sérumalbumine dénaturée standard de 0.2%, et la solution de trypsine employée est à 400  $\mu\text{g/ml}$  (rapport substrat/enzyme = 30). Dans les essais avec le substrat en quantité saturante, la sérumalbumine dénaturée standard est à une concentration de 2% et la solution de trypsine employée contient 200  $\mu\text{g/ml}$  d'enzyme (rapport substrat/enzyme = 600).

TABLEAU I  
ACTION DES MÉTAUX SUR LA PROTÉOLYSE DE LA SÉRUMALBUMINE DÉNATURÉE STANDARD

Métal	Rapport substrat/enzyme			
	30 (substrat limitant)		600 (substrat saturant)	
	Concentration en métal 10 <sup>-2</sup> M      10 <sup>-3</sup> M		Concentration en métal 10 <sup>-2</sup> M      10 <sup>-3</sup> M	
Mn	63	91	108	103
Ca	80	96	116	104
Sr	83	98	111	100
Mg	84	97	113	99
Ba	89	100	109	100
Co	—	83	100	100
Complexone	85	92	103	100
Témoin	100		100	

Le Tableau I donne les résultats obtenus exprimés en pourcentage de la valeur donnée par l'essai fait en présence de tampon seul. Les valeurs données par le cobalt ne sont pas tout à fait comparables aux autres parce que ce métal provoque dans ces conditions une légère précipitation de la protéine. Avec les sulfates de cuivre et de zinc, cette précipitation est si importante que l'essai est rendu impossible. Le Tableau I montre

que tous les métaux expérimentés et la complexone, diminuent la sensibilité de la sérumalbumine dénaturée standard à l'action de la trypsine; parmi eux, le manganèse a l'effet le plus marqué. Il montre aussi que ces mêmes métaux, ou bien n'ont aucun effet sur la trypsine, ou bien augmentent son activité apparente. On doit penser qu'ils augmentent la quantité de la forme active de l'enzyme comme cela a été déjà démontré dans le cas du calcium et du manganèse<sup>1, 2</sup>.

La Fig. 2 montre l'influence du calcium et du manganèse à des concentrations moléculaires différentes sur le degré de protéolyse d'une solution à 0.2% de sérumalbumine dénaturée standard, provoquée par une quantité de trypsine de 400 µg/ml, dans les conditions habituelles. La sérumalbumine étant en quantité limitante, les valeurs mesu-

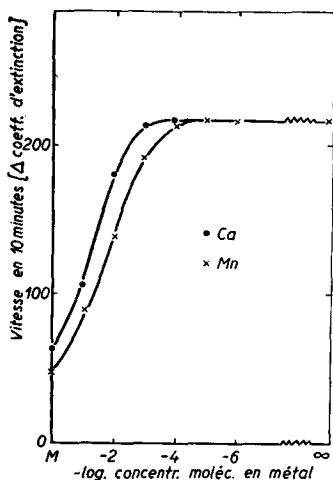


Fig. 2. Vitesse de protéolyse de la sérumalbumine dénaturée standard, en quantité limitante, en fonction de la concentration en métal. Sérumalbumine 0.2%; Trypsine 400 µg/ml

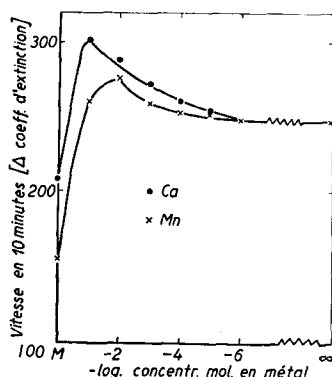
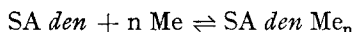


Fig. 3. Vitesse de protéolyse de la sérumalbumine dénaturée standard, en quantité saturante, en fonction de la concentration en métal. Sérumalbumine 2%; Trypsine 200 µg/ml

rées dépendent de la concentration du substrat. L'allure des courbes est assez comparable à celle d'une courbe classique d'une dissociation obéissant à la loi d'action de masses. On doit donc avoir:



SA<sub>den</sub> représente la sérumalbumine dénaturée standard libre, et SA<sub>den</sub> Me<sub>n</sub> le complexe de cette dernière avec le métal. Bien entendu, par notre méthode, nous suivons la formation du complexe protéine-métal seulement par l'influence que cette formation exerce sur la sensibilité de la protéine à la trypsine; mais les autres possibilités d'union du métal avec la protéine ne modifiant pas cette sensibilité, nous échappent. C'est avec cette restriction qu'il convient d'interpréter l'équilibre donné ci-dessus, et ceux que nous donnerons par la suite. Sur la gauche des courbes de la Fig. 2, on peut prévoir un palier représentant la vitesse de protéolyse du complexe SA<sub>den</sub> Me<sub>n</sub> non dissocié, de même que le palier de droite représente celle de la SA<sub>den</sub> libre. Le substrat est donc constitué et par la sérumalbumine dénaturée standard libre, et par son complexe avec le métal, la sensibilité de ce dernier à la trypsine étant au moins cinq fois plus faible que celle de la sérumalbumine libre. La valeur du logarithme de la concentration en métal au point

probable d'inflexion de la courbe, donne l'ordre de grandeur de la concentration, qu'il faut employer pour que la moitié des liaisons peptidiques constituant le substrat de la trypsine, soit rendue inattaquable par l'enzyme. Pour le manganèse, elle est ici de l'ordre de  $10^{-2}$ , et pour le calcium de  $3 \cdot 10^{-2}$ .

La Fig. 3 concerne les résultats obtenus dans une expérience analogue à la précédente, mais dans laquelle le substrat est en quantité saturante, la concentration de la solution de trypsine étant de 200  $\mu\text{g/ml}$  et celle de la sérumalbumine de 2%. Il est clair que l'augmentation de la quantité de trypsine active provoquée par le métal, ne permet pas à l'action simultanée et en sens inverse de ce métal sur le substrat, d'être toujours évidente. C'est seulement avec une grande concentration en métal, que cette dernière devient prédominante.

Si l'on revient à la Fig. 1, il est possible maintenant de faire de nouvelles remarques sur l'allure particulière des courbes relatives aux expériences faites en présence de calcium ou de manganèse. En effet, les variations dans la concentration de sérumalbumine en présence d'une quantité fixe de métal, provoquent des variations dans la composition du substrat qui, on le sait, est un mélange de SA *den* libre et de SA *den* Me<sub>n</sub>. Les courbes en question correspondent donc à un substrat de composition non définie, pour lequel la trypsine change continuellement d'affinité.

#### *Protéolyse de la sérumalbumine ordinaire*

Si l'on soumet la solution à 2% de sérumalbumine ordinaire à l'action de la trypsine (400  $\mu\text{g/ml}$ ) et si l'on suit la protéolyse en fonction du temps, on observe après les premières minutes d'action, une diminution brusque de la vitesse de protéolyse: elle devient 1/7 à peu près de celle du départ, et se maintient constante pendant un temps assez long\* (voir les courbes de la Fig. 4). Il est évident que la sérumalbumine ordinaire n'est pas une substance homogène: elle contient au moins deux types de liaisons peptidiques, A et B, différemment sensibles à la trypsine; ces deux types peuvent correspondre soit à deux molécules différentes, soit à deux types de liaison dans la même molécule. Quant aux relations possibles entre A et B: ou il peut s'agir de deux substrats indépendants dans les conditions d'expérience, ou encore A et B peuvent dériver l'un de l'autre (A vers B) pendant le cours même de l'expérience, et un équilibre peut exister entre eux. Les expériences faites à ce sujet, qui font l'objet d'un travail en cours, ne semblent pas contredire la deuxième hypothèse, qu'on doit alors préciser de la façon suivante: il s'agit de la formation d'un substrat B à partir d'une protéine A insensible à l'action de la trypsine<sup>6</sup>. Le schéma de la réaction devient donc le suivant:



La vitesse de formation de B à partir de A est petite par rapport à la vitesse d'hydrolyse de B. Pendant les premières minutes (première période) la protéolyse se poursuit aux dépens surtout de la quantité de B présente au moment de l'addition de l'enzyme; après cette première période, la vitesse devenue constante (deuxième période) n'est pas

\* Ce brusque changement de vitesse avait été interprété dans un travail précédent<sup>1</sup> comme une indication que la saturation de l'enzyme avait été atteinte, et qu'on avait rejoint la vitesse maximum. L'existence d'une deuxième période de protéolyse, de toute manière, ne rend pas moins valable la supposition faite dans le travail cité, à savoir que la sérumalbumine ordinaire est constituée surtout par une grande partie de protéine inattaquable, et seulement par une petite quantité de substrat réel, dérivant de la première. Cette supposition conserve toute sa validité comme hypothèse de travail, ainsi qu'on le verra dans la suite de la discussion.

celle de la protéolyse du substrat B, mais celle de la vitesse de la réaction  $A \rightarrow B$  qui est devenue le facteur limitant du système.

Les courbes de la Fig. 4 représentent, en fonction du temps, la protéolyse à deux températures différentes, en absence et en présence de manganèse ( $10^{-2} M$ ), d'une solution à 2% de sérumalbumine ordinaire traitée par une solution de trypsine à 200  $\mu g/ml$ . On voit que le rapport des vitesses de protéolyse obtenues à  $0^\circ$  et à  $24^\circ$  pour la première période de l'hydrolyse, reste le même, en présence ou non de métal, et il a une valeur voisine de 5; tandis que pour la deuxième période de protéolyse, ce même rapport, encore de 5 lorsque le manganèse est présent, atteint la valeur de 10 en l'absence de ce dernier. Ces différences entre les coefficients de température indiquent que dans la deuxième période un autre phénomène vient s'ajouter à celui de la protéolyse, et que ce phénomène est contre-carré par la présence de manganèse. Il s'agit de la réaction  $A \rightarrow B$ . Ainsi, dans le cas de la sérumalbumine ordinaire, l'addition du métal provoquerait donc non seulement une diminution de sensi-

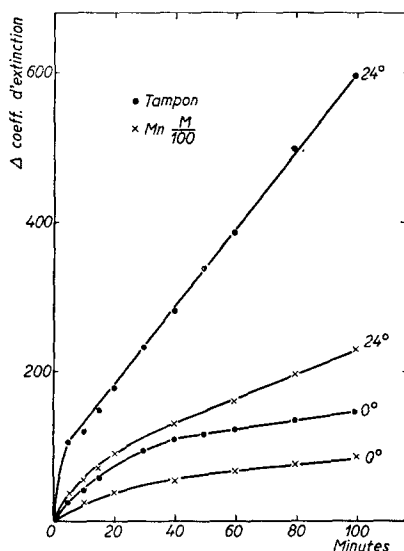


Fig. 4. Protéolyse en fonction du temps, à deux températures différentes, en présence et en absence de Mn, de la sérumalbumine ordinaire. Sérumalbumine 2%; Trypsine 200  $\mu g/ml$

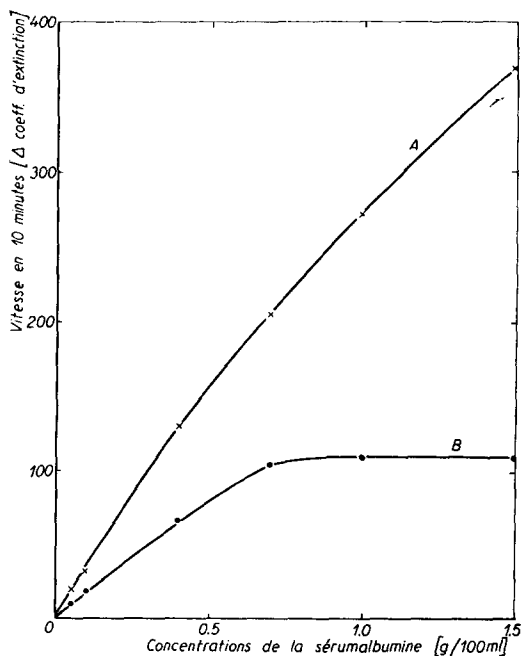


Fig. 5. Vitesse de protéolyse en fonction de la concentration de la sérumalbumine ordinaire. Trypsine 400  $\mu g/ml$

lité du substrat, mais aussi une diminution dans la vitesse de sa formation.

La relation entre les deux vitesses de protéolyse et la concentration du substrat est exprimée par les courbes de la Fig. 5 qui sont le résultat d'une expérience faite avec une solution de trypsine de 400  $\mu g/ml$  agissant sur la sérumalbumine ordinaire à différentes concentrations.

La courbe A concerne la vitesse en 10 minutes, calculée d'après les valeurs de protéolyse obtenues pendant les 3 premières minutes d'action; elle correspond à l'hydrolyse d'un substrat dont la quantité ne devient jamais saturante pour l'enzyme présent, du moins pour les concentrations maximum en sérumalbumine atteintes dans l'expérience (2%). La courbe B donne la vitesse en 10 minutes mesurée après avoir laissé s'écouler les 10 premières minutes d'action. Les vitesses mesurées entre 10 et 20 minutes, ou entre 20 et 30 minutes, donnent deux courbes superposables: on voit donc qu'il s'agit ici d'un phénomène d'allure uniforme et on peut

en déduire dans quels rapports quantitatifs, entre trypsine et sérumalbumine ordinaire, la formation de B devient suffisamment grande pour saturer l'enzyme présent.

*Action des ions métalliques sur la protéolyse de la sérumalbumine ordinaire*

L'action des métaux a été étudiée dans deux conditions. La première a été réalisée en faisant agir une solution de trypsine dialysée à 600  $\mu\text{g/ml}$  sur une solution de sérumalbumine ordinaire à 0.2% (rapport substrat/enzyme = 20). D'après la courbe B de la Fig. 4, dans ce cas l'enzyme est en excès. Dans la deuxième condition, une solution de trypsine dialysée à 200  $\mu\text{g/ml}$  agit sur une solution de sérumalbumine ordinaire à 2% (rapport substrat/enzyme = 600). Ici l'enzyme est complètement saturé. Les métaux sont employés à la concentration de  $10^{-3} M$ .

TABLEAU II  
ACTION DES MÉTAUX SUR LA PROTÉOLYSE DE LA SÉRUMALBUMINE ORDINAIRE

Métal ( $10^{-3} M$ )	Première période de protéolyse	Deuxième période de protéolyse	
		Rapport substrat/enzyme	
		20 (trypsine en excès)	600 (trypsine saturée)
Mn	80	45	47
Ca	87	65	76
Sr	95	100	100
Mg	89	82	85
Ba	97	100	100
Co	85	62	86
Complexone	100	85	89
Témoin	100	100	100

Le Tableau II donne les vitesses de protéolyse pour chacune de ces conditions, mesurées entre 0 et 10 minutes (période I), et entre 10 et 20 minutes d'action (période II), exprimées en pourcentage de la valeur obtenue avec le tampon seul. On voit que sur la sérumalbumine ordinaire, les métaux lorsqu'il s'agit de la période II de protéolyse, ont une action beaucoup plus grande, et à une concentration beaucoup plus faible que sur la sérumalbumine dénaturée standard. Cette action est si forte qu'elle est encore positive, tout en devenant plus faible, lorsque la trypsine est complètement saturée. Dans le cas de la période I, l'action des métaux est beaucoup plus faible, et elle se rapproche de celle obtenue avec la sérumalbumine dénaturée standard.

La Fig. 6 montre l'influence du calcium et du manganèse employés à des concentrations moléculaires différentes, sur la vitesse de protéolyse mesurée entre les 10 et les 20 premières minutes d'action, d'une solution de trypsine à 600  $\mu\text{g/ml}$  sur une solution à 0.2% de sérumalbumine ordinaire. On est ainsi dans la deuxième période d'action de la trypsine, l'enzyme étant en excès.

La courbe de la Fig. 6 qui concerne le manganèse montre deux paliers, et sur la gauche elle tombe pratiquement à zéro. On voit que la diminution de la sensibilité de la protéine lorsqu'on augmente la concentration en métal, se fait en deux stades, ce qui montre que l'action du métal s'accomplit par deux effets différents, chacun exigeant une concentration propre d'ion métallique. Pour obtenir une action égale à la moitié de la

grandeur totale du premier effet, il faut employer une concentration de manganèse de l'ordre de  $10^{-4}$  M. Pour le deuxième effet, on doit aller jusqu'à  $10^{-1}$  M. Pour le calcium, ces valeurs sont plus grandes, mais moins facilement déterminables. D'après l'interprétation considérant la deuxième période de protéolyse comme l'expression de la vitesse de formation de la protéine attaquable B à partir de la protéine A inattaquable, on peut expliquer ces résultats de la façon suivante: le métal, lorsqu'on augmente sa concentration, agit d'abord en déplaçant l'équilibre  $A \rightleftharpoons B$  en faveur de A, par suite de la formation d'un complexe Prot A Me dont la constante de dissociation est voisine de  $10^{-4}$ ; puis en donnant avec B un complexe Prot B Me moins sensible que B libre à la trypsine, et dont la constante de dissociation est proche de la valeur de  $10^{-1}$ .

La même expérience faite dans des conditions de substrat saturant donne des courbes analogues, un peu plus déplacées vers la gauche, tandis que les courbes qu'on peut dessiner d'après les vitesses données dans les 10 premières minutes d'action, c'est-à-dire se référant au substrat hydrolysé pendant la période I, sont assez comparables à celles de la Fig. 2, obtenues avec la sérumalbumine dénaturée standard.

#### *Action de la sérumalbumine protégeant la trypsine en présence et en absence de métal*

L'interprétation des résultats obtenus par l'action des métaux sur la trypsine lorsque la sérumalbumine dénaturée standard est en quantité saturante, est compliquée du fait qu'on doit s'attendre en même temps à une action protectrice exercée sur l'enzyme par le substrat. Il était donc utile d'étudier séparément autant que possible les deux actions: celle des métaux et celle du substrat. Pour ce faire, on a choisi des conditions de température telles que l'inactivation irréversible de la trypsine et sa protection par le calcium soit bien évidente. D'après le travail déjà cité<sup>1</sup> on sait qu'à  $37^\circ$ , la trypsine en solution dans du tampon borate à pH 7.9 perd 50% de son activité après 60 minutes, tandis que la présence de calcium  $10^{-2}$  M. la protège complètement. On a donc fait des essais de protéolyse à cette température.

La Fig. 7 montre les résultats obtenus en laissant agir à  $37^\circ$  une solution de trypsine à  $20 \mu\text{g/ml}$  sur de la sérumalbumine dénaturée standard à 2%, donc en très grand excès, en absence et en présence de calcium  $10^{-2}$  M. Les quantités de protéolyse sont exprimées en fonction du temps. On voit que la vitesse de protéolyse se maintient uniforme soit en présence soit en l'absence de calcium, pendant un temps excédant largement celui qui aurait suffi pour réduire de moitié la quantité de tryp-

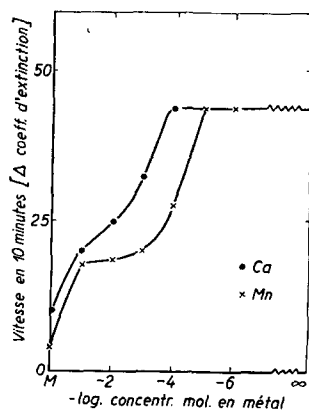


Fig. 6. Vitesse de protéolyse de la sérumalbumine ordinaire pendant la deuxième période de protéolyse, en fonction de la concentration en métal. Sérumalbumine 0.2%; Trypsine 600  $\mu\text{g/ml}$

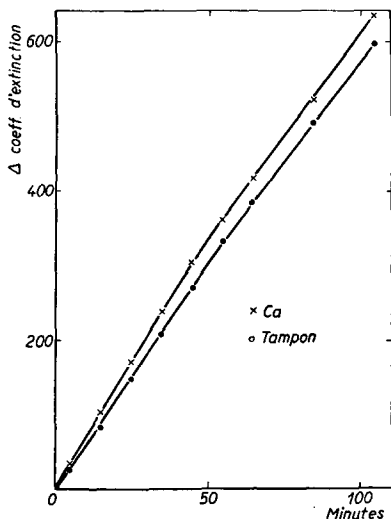


Fig. 7. Protéolyse en fonction du temps de la sérumalbumine dénaturée standard. Sérumalbumine 2%; Trypsine  $20 \mu\text{g/ml}$ ; Température  $36^\circ$

sine active présente si cette dernière avait été conservée seule à la même température. On voit également que cette vitesse, en présence de calcium, est toujours supérieure à celle obtenue sans métal. La présence de substrat, ainsi que celle de calcium, protège donc la trypsine de son inactivation irréversible, mais le métal favorise encore plus le cours de la protéolyse.

Cette même expérience montre aussi que dans les limites de nos conditions de travail, on n'a pas à enregistrer une intervention des produits d'hydrolyse dans l'activité enzymatique. En effet, dans les essais faits à 25°, avec une quantité de trypsine dix fois supérieure, on pourrait penser que la vitesse de protéolyse tend à baisser après 10 minutes d'action, la concentration des produits de la réaction étant rendue suffisante pour que ces derniers commencent à devenir inhibiteurs pour l'activité enzymatique. La valeur du coefficient d'extinction de la partie des produits de protéolyse solubles dans l'acide trichloracétique dépend de la concentration de ces produits, et elle est de l'ordre de 0.270 au moment de l'inflexion de la courbe. Si cette interprétation était correcte, l'effet du calcium pourrait être attribué à une action détoxifiante de ce métal contre les produits de l'hydrolyse. Or, dans l'expérience de la Fig. 7, on n'enregistre aucune diminution de vitesse lorsque le coefficient d'extinction atteint la même valeur de 0.270, et bien que les produits de l'hydrolyse soient, par rapport à la quantité d'enzyme, dix fois plus concentrés que dans les expériences à 25°. Dans nos conditions de travail donc, la vitesse de protéolyse baisse par manque de substrat, et non pas à cause de l'accumulation des produits d'hydrolyse, et l'effet du calcium ne peut donc pas être attribué à une action détoxifiante vis à vis de ces produits. Des expériences de protéolyse faites en présence d'une solution des produits obtenus par action de la trypsine sur la sérumalbumine, confirment ces résultats.

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il résulte des investigations qui font l'objet du présent travail, que certains ions métalliques bivalents sont capables de faire diminuer d'une façon très importante, et même de réduire à zéro, la protéolyse de la sérumalbumine par la trypsine. On peut obtenir cet effet avec toutes les formes de sérumalbumine étudiées, correspondant à différents degrés de dénaturation. Nous avons pris en considération deux formes: une première constituée par la fraction V du plasma de boeuf, le fractionnement étant fait selon COHN ET EDSALL<sup>7</sup>, à l'alcool, dans des conditions de température et de force ionique bien définies. Nous l'appelons ici "sérumalbumine ordinaire", laissant de côté toute discussion sur les changements que la protéine peut avoir subis au cours de son extraction par rapport à ce qu'elle était *in vivo*. La deuxième forme étudiée est autant éloignée de la forme *in vivo* que peut l'être la sérumalbumine ordinaire chauffée à 127° pendant 30 minutes, en solution à pH 7.9 et que nous avons désignée ici comme "sérumalbumine dénaturée standard".

Dans nos conditions d'expérience, cette diminution de protéolyse ne peut pas être attribuée, comme on l'a vu, à une action des métaux sur l'enzyme ou sur les produits d'hydrolyse; elle doit donc dériver d'une action directe des métaux sur le substrat. En effet, la sérumalbumine donne avec les métaux étudiés des complexes qui ont une sensibilité à la trypsine beaucoup plus réduite que la sérumalbumine libre, et pouvant aller jusqu'à une insensibilité complète. L'action des métaux est immédiate, et il suffit que les ions en question soient présents pendant le cours de la protéolyse, sans aucune période d'incubation préalable avec la sérumalbumine.

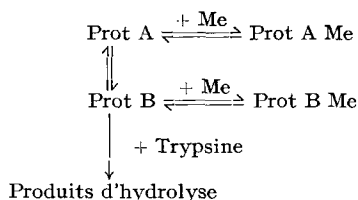
L'ensemble de tous les résultats fait penser à une réaction de double décomposition entre deux sels: les groupements anioniques de la protéine salifiés avec les métaux alcalins apportés par le tampon à pH 7.9, et le sel du métal bivalent ajouté, échangent leurs cations. Les métaux bivalents étudiés qui s'unissent de cette façon à la protéine, perdent leur propriété de donner des ions en solution. Comme dans le cas de leurs complexes avec certains acides gras hydroxylés, ils se lient à la protéine non seulement par les forces ioniques classiques (par exemple avec le deuxième carboxyle des acides aminés dicarboxyliques), mais aussi par des forces polaires (par exemple avec les groupements OH des acides aminés hydroxylés). Mais il n'est pas moins vrai que ces unions restent complètement réversibles. Ainsi, il est bien connu que la quantité de calcium contenue dans un sac à dialyse renfermant une protéine, demeure supérieure à celle contenue dans l'eau qui est à l'extérieur du sac, même dans des conditions d'équilibre<sup>8,9</sup>. Mais une dialyse prolongée contre de l'eau courante, ou l'addition d'un réactif spécifique d'affinité convenable, peuvent éloigner complètement le métal lié à la protéine.

On sait également que la sérumalbumine peut donner des complexes avec un grand nombre de substances. En particulier, le caractère amphotère de la molécule protéique, lui permet de former des complexes avec les anions comme avec les cations. Les travaux de DUGGAN ET LUCK<sup>10</sup> ont démontré que la sérumalbumine peut même être protégée contre la dénaturation, en se complexant avec des acides gras de structure particulière, comme elle le fait avec les métaux. Il convient d'interpréter le comportement de la complexone observé dans ce travail, en se basant sur ces considérations. Le fait que l'acide éthylènediaminotétracétique (complexone) agit sur la sensibilité de la sérumalbumine dans le même sens que les métaux, exclut la possibilité que dans ce cas, cette substance puisse agir indirectement en tant que réactif d'un métal présent en traces dans la protéine. Ce cas particulier fournit donc une preuve que la complexone peut avoir aussi une action propre qui s'explique par une union directe de ce corps avec la sérumalbumine, la complexone étant l'anion et la protéine fournissant les groupements cationiques.

Les différences quantitatives dans l'ensemble des forces constituant l'affinité des substances étudiées pour la sérumalbumine, expliquent en partie les actions quantitativement très différentes des divers métaux et acides. Une étude plus approfondie dans le cas du calcium et du manganèse, montre que la réduction maximum de sensibilité qu'on peut obtenir avec une même forme de sérumalbumine, est vraisemblablement toujours du même ordre, quel que soit le métal employé, ce qui change étant seulement la concentration en métal nécessaire à cet effet. Il n'est pas facile d'imaginer comment les ions étudiés, en s'unissant à la sérumalbumine, provoquent une diminution de sa sensibilité à la trypsine. De toute façon, les courbes de saturation par le calcium et le manganèse montrent que cette diminution de sensibilité dépend de la présence de ces ions suivant la loi de l'action de masses. Une molécule de sérumalbumine s'unit à  $n$  atomes de métal (ou d'acide), donnant ainsi lieu à un complexe dans lequel un certain type des liaisons peptidiques constituant le substrat de la trypsine, est bloqué. Il en résulte une protéine beaucoup moins sensible à la trypsine que la sérumalbumine libre du départ. Il est possible que le complexe, à son tour, s'unisse, par un autre degré d'affinité, à  $n'$  atomes de métal, et forme un nouveau complexe. Ce dernier rend inattaquable une nouvelle quantité des liaisons peptidiques intéressant la trypsine, et ainsi de suite, jusqu'à soustraire à l'action de cet enzyme toutes les liaisons peptidiques qui formaient son substrat. Pour la sérumalbumine dénaturée standard, et dans nos conditions d'expériences, la sensibilité à la trypsine a pu être réduite au maximum au cinquième de sa valeur normale, et

la quantité de métal nécessaire pour atteindre la demi saturation est assez élevée: 35 atomes de Mn, le métal le plus puissant, pour chaque molécule de sérualbumine.

Mais la formation des complexes métalliques provoque également la perte de sensibilité de la sérualbumine à la trypsine, d'une autre manière. En effet, on peut supposer qu'une protéine, dans certains états de dénaturation, est constituée par un mélange de deux formes, A et B, en équilibre, la forme B seule étant attaquable par la trypsine. Dans ce cas, les métaux donnant des complexes avec l'une comme avec l'autre forme, peuvent entraîner la diminution de la concentration du substrat (la forme B) par deux voies: en se complexant avec la forme B elle-même, mais aussi avec la forme A, ce qui déplace l'équilibre entre A et B en faveur de A. Le schéma le plus simple à proposer est alors le suivant:



Et si l'on suppose que l'affinité du métal est beaucoup plus grande pour la forme A que pour la forme B, on voit que la diminution du substrat B est due surtout au déplacement de l'équilibre entre A et B. C'est ce qui a lieu probablement dans le cas de la sérualbumine ordinaire. D'après son comportement particulier pendant le cours de sa protéolyse, il semble que cette dernière soit constituée par un mélange de protéine A et de protéine B. Pendant la première période de protéolyse qui correspond essentiellement à l'hydrolyse de la protéine B déjà présente, le métal agit en donnant lieu au complexe Prot B Me, moins attaquant. Pendant la deuxième période qui est l'expression de la vitesse de formation de B, le métal agit sur cette vitesse en se complexant avec Prot A pour laquelle il aurait une plus grande affinité que pour Prot B. Et c'est aux grandes concentrations de métal seulement, que l'effet dû à la formation du complexe Prot B Me, viendrait s'ajouter à celui du complexe Prot A Me dans le phénomène de protéolyse. En effet, les résultats obtenus avec la sérualbumine ordinaire montrent que pendant la première période de protéolyse, la présence des métaux agit d'une façon assez comparable au comportement de la sérualbumine dénaturée standard; pour le deuxième, il suffit de concentrations en métal cent fois plus faibles pour obtenir un effet déjà très net, et si l'on augmente la concentration en métal, on peut, après avoir dépassé un premier palier, arrêter complètement toute action protéolytique.

Pour conclure, en ce qui concerne la sérualbumine, les résultats de nos recherches antérieures<sup>1</sup> se trouvent ainsi confirmés: l'action des métaux étudiés porte non seulement sur l'enzyme mais aussi sur le substrat, contrairement à l'opinion exprimée par d'autres auteurs<sup>2</sup>. Bien que nos recherches portent seulement sur des formes dénaturées de la sérualbumine, les résultats permettent d'envisager d'une façon dynamique la possibilité de résistance d'une protéine aux enzymes protéolytiques *in vivo*. Et on peut considérer l'action des métaux étudiés comme le facteur prédominant dans ce phénomène, si l'on pense à leur grande diffusion dans le monde vivant, et au fait que déjà pour la forme de la sérualbumine que nous appelons "ordinaire", il suffit d'une concentration en métal de l'ordre de  $10^{-4} M$ , c'est-à-dire cent fois plus petite que pour la forme dénaturée standard, pour réduire de plus de moitié la sensibilité de la protéine à la trypsine.

Quant au comportement de la trypsine, les présents résultats montrent que les valeurs obtenues quand le substrat employé est la sérumalbumine, ne peuvent que donner une indication sur la qualité de l'action, positive ou négative, que ces métaux exercent sur la trypsine, mais ne sont pas l'expression quantitative de cet effet. Un premier examen des résultats actuels paraîtrait les mettre en désaccord avec ceux obtenus précédemment, lors de l'étude de l'action des métaux sur l'inactivation irréversible de la trypsine due à une élévation de température. Dans ce dernier cas seuls le calcium et le manganèse avaient une action importante, du même ordre de grandeur, et les autres métaux restaient sans effet. Dans les conditions du présent travail, tous les métaux paraissent avoir une action; celle du manganèse est non seulement moindre que celle du calcium, mais aussi inférieure à celle de la plupart des autres métaux. L'explication de ces différences de comportement est à rechercher dans les conditions différentes des deux séries d'expériences. Dans le premier cas, l'action du métal s'exerce sur la trypsine soumise à une élévation de température, mais en l'absence de toute autre protéine: ainsi le métal peut agir seulement sur l'enzyme. Dans le cas actuel, le métal est mis en présence à la fois de la trypsine et du substrat sérumalbumine: il s'établit donc une compétition des deux protéines pour l'ion métallique. Il faut encore ajouter que le phénomène de protection de la trypsine contre l'inactivation provoquée par une élévation de température étudiée dans le travail cité, n'est pas complètement comparable à celui qu'on étudie dans les expériences actuelles: dans le premier cas l'action des métaux porte sur la vitesse d'une réaction irréversible, tandis que dans le deuxième cas leur action est essentiellement celle de provoquer le déplacement d'un équilibre entre une forme active et une forme inactive de la trypsine. Il est évident que pour l'étude de l'action des métaux sur la trypsine, on doit avoir recours à des substrats dont l'insensibilité aux ions métalliques a été démontrée. *A priori* il n'est pas possible d'affirmer qu'il en est ainsi pour des peptides simples, surtout après les observations de GILBERT, OTEY ET PRICE<sup>11</sup> sur la diminution de sensibilité aux peptidases de certains dipeptides complexés par le cobalt.

## RÉSUMÉ

L'addition à une solution de sérumalbumine à pH 7.9 des sels ionisés de certains métaux bivalents tels que le calcium et le manganèse (et à un moindre degré le cobalt et le magnésium), provoque la formation immédiate de complexes métalliques de la protéine très peu attaquables par la trypsine et même complètement inattaquables.

Cette propriété de donner des complexes subsiste, quel que soit le degré de dénaturation de la sérumalbumine. Mais le mécanisme qui commande la diminution de sensibilité à la trypsine est double, et dépend des états de dénaturation de la protéine. Le métal peut agir directement (sérumalbumine traitée par la chaleur) en se complexant avec la sérumalbumine pour donner lieu à un substrat moins sensible à la trypsine. Dans d'autres cas (sérumalbumine non traitée par la chaleur), le métal joue un rôle indirect en agissant sur l'équilibre qui existe entre deux formes de sérumalbumine: une seule de ces formes est attaquable par la trypsine, et le métal déplace l'équilibre vers l'autre forme pour laquelle il possède une plus grande affinité. La concentration de manganèse nécessaire pour obtenir la moitié de l'effet total qu'il peut provoquer, est de  $10^{-2} M$  pour la sérumalbumine traitée par la chaleur, et de  $10^{-4} M$  pour celle non chauffée. Pour le calcium, ces concentrations sont légèrement supérieures. Le manganèse et le calcium sont donc de puissants régulateurs de la protéolyse de la sérumalbumine par la trypsine.

L'acide éthylènediaminotétracétique (complexone) a une action propre, dans le même sens que celle des métaux, et ne dérivant pas du fait que ce corps est un réactif des métaux étudiés.

L'action de ces substances sur le substrat s'ajoute et s'oppose à celle qu'elles ont vis à vis de la trypsine. De ce fait, les substrats protéiques ne sont pas indiqués dans une étude du comportement de la trypsine en présence de différents métaux.

## SUMMARY

The addition of ionised salts of certain bivalent metals such as calcium and manganese (and to a lesser degree, cobalt and magnesium) to a solution of serumalbumin at pH 7.9 provokes the immediate formation of metallic complexes of the protein, which are nearly, if not completely, unattacked by trypsin.

This property of forming complexes exists regardless of the degree of denaturation of the serumalbumin. But the mechanism which controls the diminution of sensitivity toward trypsin is twofold, and depends on the states of denaturation of the protein. The metal can react directly (with serumalbumin warmed) to form complexes with the serumalbumin which is a substrate less sensitive to trypsin. In other cases (serumalbumin not warmed) the metal plays an indirect role by influencing the equilibrium which exists between two forms of serumalbumin; one only of these forms is attackable by trypsin and the metal displaces the equilibrium towards the other form, for which it possesses a greater affinity. The concentration of manganese necessary to obtain half of the total effect which it can provoke is  $10^{-2} M$  for the heated serumalbumin, and  $10^{-4} M$  for the non-heated serumalbumin. For calcium, these concentrations are slightly higher. Manganese and calcium are thus powerful regulators of the proteolysis of serumalbumin by trypsin.

Ethylenediaminetetracetic acid (complexone) has its own action in the same sense as that of the metals, and not due to the fact that this compound is a reagent of the metals studied.

The action of these substances on the substrate is opposite to that which they have with regard to trypsin. Because of this fact, the protein substrates are not indicated in a study of the behaviour of trypsin in the presence of different metals.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Zugabe, zu einer Serumalbumin-Lösung von pH 7.9, von ionisierten Salzen verschiedener zweiwertiger Metalle wie Calcium und Mangan (und in geringerem Masse Kobalt und Magnesium), bewirkt die sofortige Bildung von Metallkomplexen des Proteins, welche sehr wenig oder gar nicht durch Trypsin angegriffen werden.

Diese Eigenschaft der Komplexbildung bleibt bestehen, wie sehr das Serumalbumin auch denaturiert sein möge. Aber der Mechanismus, welcher die Verminderung der Trypsin-Empfindlichkeit beherrscht, ist zweifach, und hängt vom Denaturierungsgrad des Proteins ab. Das Metall kann direkt wirken (wärmebehandeltes Serumalbumin) indem es mit dem Serumalbumin einen Komplex gibt und so ein gegenüber Trypsin weniger empfindliches Substrat liefert. In anderen Fällen (nicht wärmebehandeltes Serumalbumin) spielt das Metall eine indirekte Rolle, indem es auf das zwischen zwei Formen von Serumalbumin bestehende Gleichgewicht wirkt: nur eine dieser Formen wird durch Trypsin angegriffen und das Metall verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der anderen Form, für welche es eine grössere Affinität besitzt. Die Konzentration von Mangan, welche nötig ist um die Hälfte des für dieses Metall möglichen Totaleffektes zu erreichen, ist  $10^{-2} M$  für wärmebehandeltes und  $10^{-4} M$  für nicht erwärmtes Serumalbumin. Für Calcium sind diese Konzentrationen etwas höher. Mangan und Calcium sind also mächtige Regulatoren der Proteolyse von Serumalbumin durch Trypsin.

Komplexon hat eine eigene Wirkung im gleichen Sinne wie die Metalle; sie ist nicht durch die Tatsache verursacht, dass diese Verbindung ein Reaktiv für die untersuchten Metalle ist.

Diese Substanzen wirken also auch auf das Substrat und diese Wirkung ist der Wirkung auf Trypsin entgegengesetzt. Daher sind Proteinsubstrate für ein Studium des Verhaltens von Trypsin in Gegenwart verschiedener Metalle nicht geeignet.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 318.
- <sup>2</sup> M. BIER ET F. F. NORD, *Arch. Biochem.*, 33 (1951) 320.
- <sup>3</sup> O. G. BENTLEY, *Federation Proc.*, 10 (1951) 161.
- <sup>4</sup> W. M. CLARK, *The Determination of Hydrogen Ions*, Baltimore, 1928.
- <sup>5</sup> M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 79.
- <sup>6</sup> K. LINDERSTRÖM-LANG, *Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol.*, 14 (1949) 117.
- <sup>7</sup> J. T. EDSALL, *Adv. in Protein Chem.*, 3 (1947) 384.
- <sup>8</sup> F. G. DONNAN, *Chem. Review*, 1 (1924) 73.
- <sup>9</sup> N. H. MARTIN ET D. J. PERKINS, *Biochem. J.*, 47 (1950) 323.
- <sup>10</sup> E. L. DUGGAN ET J. M. LUCK, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 205.
- <sup>11</sup> J. B. GILBERT, M. C. OTEY ET V. E. PRICE, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 377.

Reçu le 5 décembre 1951