

INFLUENCE DU MANGANÈSE SUR LA STABILITÉ DU LYSOZYME

I. INFLUENCE DU MANGANÈSE SUR LA VITESSE D'INACTIVATION IRRÉVERSIBLE DU LYSOZYME PAR LA CHALEUR*

par

LUIGI GORINI ET FRANÇOISE FÉLIX

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

On sait¹⁻⁶ que certains ions métalliques peuvent exercer un rôle important sur la stabilité de diverses protéines. On a vu également que cette stabilité peut se traduire, suivant la protéine, soit par le maintien d'une activité enzymatique (trypsine)⁸, soit par une résistance de la protéine (sérumalbumine) à l'action hydrolysante de la trypsine⁶. Il était intéressant d'étendre ce genre de recherches au lysozyme en étudiant tout d'abord l'action protectrice de divers ions métalliques vis à vis de son inactivation irréversible par la chaleur. Cette protéine possède en effet une activité enzymatique qui s'exerce sur un substrat de nature non protéique; en outre, elle peut être obtenue à l'état cristallisé.

Des expériences préliminaires concernant l'action protectrice de divers ions métalliques sur le lysozyme en ce qui concerne son inactivation irréversible par la chaleur ont été effectuées entre 60° et 90°, températures auxquelles l'inactivation du lysozyme à pH 7.9 est suffisamment rapide pour être étudiée facilement; elles ont montré que, parmi les ions bivalents étudiés (Mn^{++} , Co^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Cu^{++}), Mn^{++} seul exerce une action protectrice marquée. C'est donc surtout l'étude de l'action de ce métal qui constitue le sujet du présent travail.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

Pour les essais d'inactivation, le lysozyme (carbonate, Armour, Chicago) est dissous dans une solution tampon borate $5 \cdot 10^{-2} M$, à pH 7.9, d'après CLARK ET LUBBS⁷. Ces solutions contiennent éventuellement les chlorures des métaux étudiés. La détermination de l'activité lysante du lysozyme se fait en solution tampon acétate véronal $3 \cdot 10^{-2} M$, à pH 7.0, d'après MICHAELIS⁸. Au moment de la mesure de son activité, l'échantillon d'enzyme qui était en milieu tampon borate se trouve dilué 12 fois en milieu tampon acétate-véronal. Le tampon borate ayant un faible pouvoir tampon à pH 7.9, la dilution dans le tampon acétate-véronal suffit pour porter le pH à 7.0. La concentration de NaCl dans ce tampon est suffisamment grande ($10^{-1} M$) pour qu'on puisse négliger les petites variations de concentration des ions Cl^- apportés par l'addition des chlorures métalliques.

Inactivation du lysozyme par la chaleur. Les solutions de lysozyme sont maintenues à la température convenable ($\pm 0^{\circ} 1$) pendant des temps déterminés, non compris le temps nécessaire à l'équilibration de la température de l'essai avec celle du bain. Ce dernier temps est de 2 minutes, en employant la technique suivante: à 4.5 ml de tampon borate préalablement équilibrés à la température

* Nous sommes heureux de remercier la Fondation Rockefeller de l'aide matérielle qu'elle a apporté à l'exécution de ce travail.

du bain, on ajoute 0.5 ml de solution enzymatique 10 fois plus concentrée que celle qu'on veut finalement obtenir, et préalablement portée à 40°. La concentration C_0 en lysozyme actif est celle qu'on détermine après 2 minutes de chauffage. Dans ces conditions, et même dans les expériences aux températures les plus élevées, la concentration C_0 est, au maximum, inférieure de 10% à celle de la même solution conservée à la glacière. Aux différentes températures, les expériences ont été poursuivies pendant des temps suffisamment longs pour que l'inactivation soit de l'ordre de 50%. En ce qui concerne l'interprétation des résultats numériques expérimentaux, après avoir vérifié qu'ils étaient compatibles avec l'équation d'une réaction de premier ordre, généralement admise pour une dénaturation de protéine, nous avons adopté l'équation classique:

$$\log \frac{C_0}{C} = \frac{Kt}{2.3}$$

où C_0 = concentration du lysozyme actif au temps zéro
 C = concentration du lysozyme actif au temps t ,
et cherché à déterminer K dans chaque cas particulier.

Détermination de l'activité enzymatique du lysozyme: Elle a été faite suivant la méthode de ALDERTON ET FEVOLD⁹ modifiée par FRAENKEL-CONRAT¹⁰. On mesure par néphéломétrie le pouvoir lysant de l'enzyme à 25° ($\pm 0^{\circ} 1$) sur une suspension bactérienne de *Micrococcus lysodeikticus*. Les cellules, lavées et séchées à l'acétone, sont mises en suspension dans le milieu tampon acétate-véronal pH 7 (24 mg de bactéries pour 100 ml). L'opacité de cette suspension reste constante dans les trois premières heures qui suivent la préparation. On mélange à 5 ml de suspension 0.5 ml de tampon véronal et 0.5 ml de solution enzymatique, et on suit la diminution d'opacité due au phénomène de lyse pendant les quatre premières minutes d'action. L'appareil utilisé est un électrophotomètre de MEUNIER, et les mesures sont faites avec le filtre rouge et une cuve de 10 mm d'épaisseur. Les valeurs des absorptions, lues dans les unités arbitraires de l'appareil, sont exprimées en fonction du temps. Si la concentration C en enzyme actif de la solution employée n'est pas supérieure à 16 µg/ml, les points compris entre 1 minute et 3 minutes (5 à 6 points) se rangent sur une droite dont la pente est proportionnelle à C . Dans nos conditions d'expérience, 1 µg/ml de lysozyme actif donne une lyse correspondant à une diminution d'opacité de 0.69 division de l'échelle du photomètre par minute. L'erreur relative sur la concentration C est de 5%.

STABILITÉ DES SOLUTION DE LYSOZYME À 0°

Plusieurs auteurs^{11, 12, 13, 14} ont observé que des solutions de lysozyme conservées même à la glacière, donnent naissance, surtout aux pH alcalins, à des modifications de lysozyme différentes quant à certaines de leurs propriétés physiques. En ce qui nous concerne, des essais de conservation de solutions de lysozyme dans du tampon borate, soit à pH 7.9 soit à pH 9.3, pendant trois semaines, n'ont fait apparaître aucune modification vis à vis du comportement à l'inactivation par la chaleur.

INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DES IONS Mn⁺⁺ SUR L'ACTIVITÉ LYSANTE DU LYSOZYME À 25°

Nous avons constaté que la présence de Mn⁺⁺ dans une solution de lysozyme augmente légèrement son activité, celle-ci atteignant en moyenne, pour Mn⁺⁺ 10⁻² M, les 115% de l'activité de l'essai sans Mn⁺⁺. Cet effet du Mn⁺⁺ a été vérifié par des expériences systématiques dans les quelles la lyse a été faite en présence de quantités variables de Mn⁺⁺. Pour une concentration du lysozyme de 14 µg/ml, l'effet du Mn⁺⁺ commence à être sensible à partir d'une concentration de 10⁻⁷ M. De toute façon, il est clair que la valeur du rapport C_0/C dans les expériences en présence de Mn, n'est pas altérée par le phénomène ci-dessus et reste comparable aux valeurs obtenues dans les expériences sans Mn⁺⁺.

Avec les autres métaux essayés à titre de comparaison (Ca, Co, Mg), nous avons observé un effet analogue, mais moins accusé et qui n'est décelable que lorsque la concentration du métal atteint 10⁻⁸ M.

IRRÉVERSIBILITÉ DE L'INACTIVATION DU LYSOZYME AUX TEMPÉRATURES
COMPRISSES ENTRE 60° ET 90°

Le degré de dénaturation atteint après chauffage aux températures ci-dessus, reste constant même après conservation de l'échantillon de lysozyme inactivé, pendant quelques jours à la glacière. Nous en avons déduit que le phénomène que nous étudions est irréversible.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU LYSOZYME SUR SON INACTIVATION PAR
LA CHALEUR

Nous avons suivi, à trois températures (60°, 70°, 80°), l'inactivation du lysozyme en solution à différentes concentrations (700, 140 et 14 µg/ml). Au moment de la lecture au photomètre, les solutions à 140 et à 700 µg/ml sont diluées au 1/10 et à 1/50, de telle sorte que tous les échantillons ont subi, soit avant, soit après l'inactivation, la même dilution.

La Fig. 1, qui indique sur un même graphique l'allure de ces courbes d'inactivation, montre que :

1. A 60°: Seule la solution la plus diluée subit une inactivation. La Fig. 1 ne donne que les résultats concernant la première heure d'inactivation, mais nous avons constaté qu'au bout de six heures, les solutions plus concentrées gardent leur activité initiale, alors que pour la solution à 14 µg/ml, cette activité est réduite à 90%.

2. A 80°: Le rôle joué par la concentration est inversé et, sauf pour le lysozyme à 14 µg/ml, on observe une précipitation qui ne nous a pas permis de faire des mesures convenables dans le cas de la plus forte concentration.

3. A 70°: La réaction n'est de premier ordre que dans le cas du lysozyme le plus dilué. Pour les autres concentrations, le phénomène est d'ordre supérieur; au départ d'autant plus lent que la concentration est grande, et à la fin d'autant plus lent que la concentration est petite.

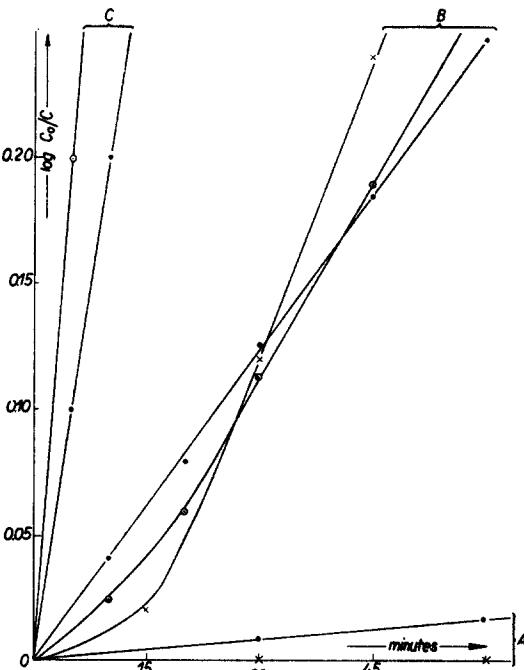


Fig. 1. Influence de la concentration du lysozyme sur son inactivation par la chaleur.

- \bullet lysozyme 14 µg/ml
 - \circ lysozyme 140 µg/ml
 - \times lysozyme 700 µg/ml
- $A =$ inactivation à 60°
 $B =$ inactivation à 70°
 $C =$ inactivation à 80°

INFLUENCE DU Mn⁺⁺ SUR L'INACTIVATION DU LYSOZYME

Les inactivations ont été faites à quatre températures (70°, 75°, 80°, 90°) en présence de différentes concentrations de Mn⁺⁺ (entre 0 et 10⁻² M) sur une solution

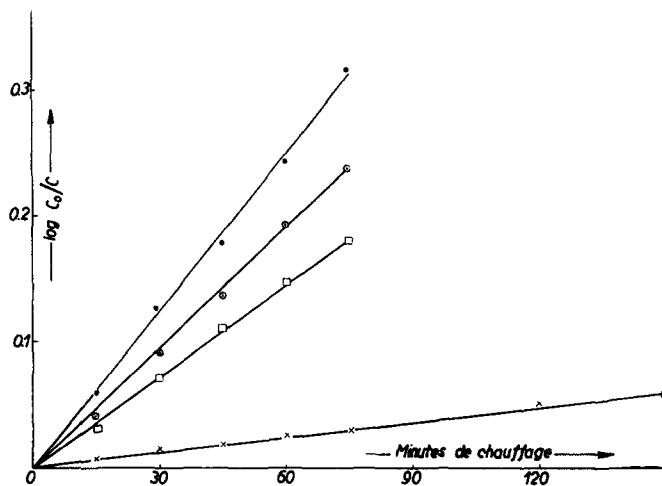


Fig. 2. Inactivation du lysozyme à 70°.

- $Mn^{++} 0$;
- $Mn^{++} 10^{-6} M$;
- $Mn^{++} 10^{-4} M$;
- × $Mn^{++} 10^{-2} M$

Fig. 3. Inactivation du lysozyme à 75°.

- $Mn^{++} 0$
- $Mn^{++} 10^{-6} M$
- $Mn^{++} 10^{-4} M$
- × $Mn^{++} 10^{-2} M$

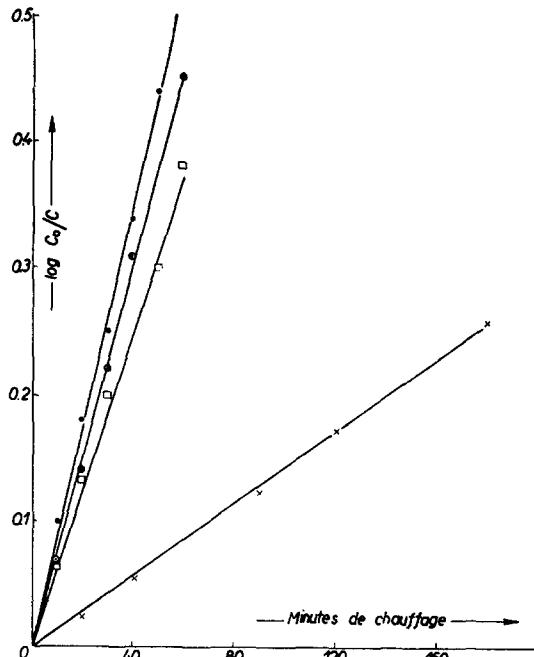
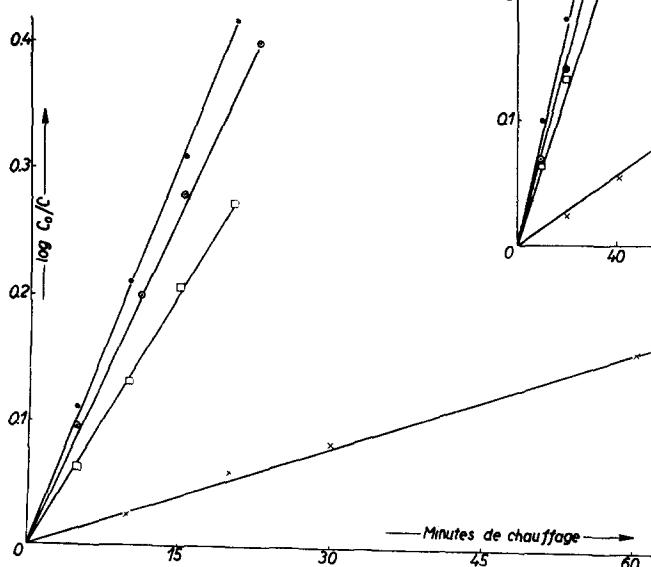


Fig. 4. Inactivation du lysozyme à 80°.

- $Mn^{++} 0$;
- $Mn^{++} 10^{-6} M$;
- $Mn^{++} 10^{-4} M$;
- × $Mn^{++} 10^{-2} M$

contenant 14 µg/ml de lysozyme. Les figures 2, 3 et 4 donnent les résultats de ces expériences aux températures de 70°, 75°, 80°.

Déjà le simple examen des courbes montre que le Mn⁺⁺ exerce, à toutes les températures, une action protectrice très nette, et d'autant plus marquée que la concentration en métal est plus élevée. Les valeurs des constantes *K* de vitesse d'inactivation, calculées d'après les pentes des droites, apportent la confirmation quantitative de ces conclusions. Elles sont données par le Tableau I, dans lequel on indique aussi le pourcentage de dénaturation atteint à la fin de chaque expérience, ce qui, joint au fait que la représentation graphique de log C_0/C en fonction du temps reste linéaire, justifie l'ordre de réaction proposé.

TABLEAU I
PROTECTION PAR Mn⁺⁺ DU LYSOZYME SOUMIS À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

Température d'inactivation	Concentration moléculaire de Mn ⁺⁺	Expérience poursuivie jusqu'à un pourcentage d'inactivation de :	$K/\text{sec}^{-1} \cdot 10^5$
70°	0	59	15.7
	10^{-6}	35	11.5
	10^{-4}	34	9.6
	10^{-2}	40	1.5
75°	0	63	33.4
	10^{-6}	60	29.0
	10^{-4}	58	23.5
	10^{-2}	44	5.4
80°	0	60	80.6
	10^{-6}	58	69.0
	10^{-4}	50	53.6
	10^{-2}	52	10.2
90°	0	70	390.0
	10^{-2}	25	42.2

En ce qui concerne les concentrations plus élevées de lysozyme, on a étudié l'action du Mn⁺⁺ sur l'inactivation du lysozyme à 140 µg/ml à la température de 80°. Les températures de 60° et de 70° ne sont pas indiquées, la première parce que le lysozyme ne s'inactivant pas sensiblement, même en l'absence de Mn⁺⁺, l'action de celui-ci ne peut être mise en évidence, la seconde parce que le phénomène est plus compliqué qu'une simple réaction de premier ordre. Le Tableau II montre que lorsque la concentration en lysozyme passe de 14 à 140 µg/ml, la constante de vitesse d'inactivation demeure la même en présence de Mn⁺⁺, alors qu'elle passe du simple au double en absence de ce métal.

TABLEAU II
PROTECTION PAR Mn⁺⁺ DU LYSOZYME INACTIVÉ À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS

Concentration moléculaire de Mn ⁺⁺	$K/\text{sec}^{-1} \cdot 10^5$	
	Lysozyme 14 µg/ml	Lysozyme 140 µg/ml
0	81	173
10^{-2}	10	10

Température d'inactivation: 80°.

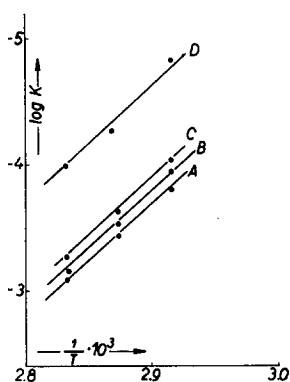
A titre de comparaison, nous avons déterminé l'action exercée par Ca^{++} et Mg^{++} sur l'inactivation à 80° d'une solution de lysozyme à $14 \mu\text{g}/\text{ml}$. Dans le cas de Ca^{++} on ne trouve qu'une très faible action protectrice, même pour une concentration aussi grande que $M \cdot 10^{-2}$; $K_{\text{Ca}} \cdot 10^5 = 73$.

RELATION ENTRE CONSTANTE DE VITESSE ET TEMPÉRATURE D'INACTIVATION

La relation entre la vitesse d'une réaction chimique et la température à laquelle elle s'effectue est donnée par l'équation :

$$\log K = -\frac{E}{2.3 R} \cdot \frac{1}{T} + C$$

obtenue par intégration de l'équation d'Arrhénius et dans laquelle :



K représente la constante de vitesse de réaction, ici réaction d'inactivation.

R la constante des gaz exprimée en calories par degré et par molécule.

T la température absolue à laquelle s'effectue la réaction.

C une constante d'intégration.

E l'énergie d'activation, ici l'énergie nécessaire à une molécule de lysozyme enzymatiquement actif pour être susceptible de passer à l'état inactif.

En représentant donc $-\log K$ en fonction de l'inverse de la température absolue, on doit obtenir une droite dont la pente est égale à $E/2.3 R$. Dans la Fig. 5, on a représenté les quatre droites correspondant aux différentes concentrations de Mn^{++} ($0, 10^{-6} M, 10^{-4} M, 10^{-2} M$). Elles sont sensiblement parallèles, et la valeur de l'énergie d'activation qu'on en déduit est de 42,000 cal/mol.

La constante C dont l'ordonnée à l'origine des droites donne ici la valeur négative, varie en sens inverse de la concentration en Mn^{++} .

DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent donc nettement que Mn^{++} protège de lysozyme contre l'inactivation irréversible provoquée par la chaleur. Cette action de Mn^{++} ne peut pas être considérée comme une action spécifique proprement dite; d'autres métaux (notamment Ca^{++}) en effet peuvent agir dans le même sens, mais avec une intensité incomparablement plus petite.

En passant à une analyse plus poussée des résultats obtenus, on peut déduire les conclusions suivantes :

a. les constantes de vitesse d'inactivation sont différentes suivant la concentration du Mn^{++} .

b. les énergies d'activation sont les mêmes dans tous les cas. On peut donc admettre que, quelle que soit la concentration de Mn^{++} , on a affaire à la même réaction d'inactivation.

Si d'autre part on suppose qu'il existe une réaction de dissociation :



et que, dans nos conditions d'expériences, le complexe "lysozyme-Mn" n'est pas susceptible de s'inactiver, on peut déduire que :

1. Dans les expériences en absence de Mn^{++} , la constante des mesures d'activité aux temps zéro et t , et d'après la formule $\log C_0/C = Kt$ est la constante réelle de la réaction d'inactivation.

2. Dans les expériences en présence de Mn^{++} , cette constante ne peut plus être la vraie constante de vitesse d'inactivation. En effet, les concentrations C_0 et C sont chacune somme de deux termes: l'un constant et égal à la concentration initiale en "lysozyme-Mn", l'autre variable et égal à la concentration en lysozyme dissocié du Mn et pas encore inactivé, c'est-à-dire dépendant à la fois du coefficient de dissociation α et de la vitesse d'inactivation. Le coefficient de dissociation α diminuant quand la concentration du Mn augmente, il s'ensuit que la constante de vitesse apparente K diminue aussi.

Les données expérimentales fournies par ce travail ne sont donc pas en désaccord avec l'hypothèse que l'effet protecteur de Mn^{++} soit dû à la formation d'un complexe avec le lysozyme, stable dans nos conditions d'expériences.

D'autre part, si on considère les expériences faites avec des solutions concentrée ($140 \mu\text{g/ml}$) ou diluée ($14 \mu\text{g/ml}$) de lysozyme, on peut faire deux remarques: 1. Les vitesses d'inactivation sont différentes; 2. suivant la température (60° ou 80°) le lysozyme en solution diluée s'inactive plus vite ou moins vite qu'en solution concentrée. On peut admettre qu'en solution concentrée, le phénomène d'inactivation du lysozyme est plus complexe qu'en solution diluée, et que la vitesse qu'on mesure alors, est la résultante des vitesses d'au moins deux processus simultanés. Suivant la température, l'un ou l'autre des phénomènes prédomine et il est même possible que l'un des deux devienne négligeable devant l'autre. Aux températures moins élevées (60°) c'est le phénomène d'inactivation proprement dite qui l'emporte et on constate que les solutions concentrées sont moins inactivées que les solutions diluées, ce qui est en accord avec ce qu'on sait sur la stabilité à la chaleur d'une protéine. Aux températures plus élevées (80°) on observe une précipitation du lysozyme en solution concentrée, ce qui suggère l'hypothèse d'un processus d'aggrégation des molécules. Le fait que pour les solutions diluée et concentrée de lysozyme, les constantes de vitesse d'inactivation sont les mêmes en présence de Mn^{++} , alors qu'elles sont très différentes en son absence (Tableau II), suggère l'idée que l'action protectrice du Mn^{++} se manifeste aussi en supprimant la réaction d'aggrégation des molécules, qu'on suppose exister en l'absence de Mn^{++} et qui est fonction de la concentration de lysozyme.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié, à des températures variant entre 60° et 90° , l'inactivation par la chaleur du lysozyme en solution à pH 7.9.

Pour des solutions diluées, la cinétique de la réaction est celle d'une réaction de premier ordre. Le Mn^{++} diminue d'autant plus la vitesse d'inactivation que la concentration en métal est grande, l'énergie d'activation de la réaction restant cependant la même.

Dans tous les cas on a affaire à l'inactivation du lysozyme dissocié du Mn^{++} , le complexe "lysozyme-Mn" restant stable dans nos conditions d'expériences. Les variations qu'on observe dans les vitesses d'inactivation en présence de Mn^{++} sont dues à l'intervention d'un facteur étranger

à la dénaturation proprement dite qui est le coefficient de dissociation du complexe "lysozyme-Mn" et qui dépend de la concentration en métal.

Pour des solutions concentrées de lysozyme, la réaction d'inactivation est plus complexe mais l'influence de Mn^{++} reste la même.

SUMMARY

The inactivation by heat of lysozyme in solution at pH 7.9 was studied at temperatures varying between 60° and 90°.

In dilute solutions the kinetic behaviour is that of a first order reaction. The Mn^{++} diminishes the rate of inactivation as the concentration of the metal ion increases, however the activation energy of the reaction remains the same.

In every case we were concerned with the inactivation of lysozyme dissociated from Mn^{++} , the "lysozyme-Mn" complex remaining stable in our experimental conditions. The variations observed in the rate of inactivation in the presence of Mn^{++} are due to the intervention of a factor foreign to the denaturation itself, which is the coefficient of dissociation of the "lysozyme-Mn" complex, and which depends on the metal ion concentration.

In the case of concentrated solutions of lysozyme, the inactivation reaction is more complicated but the influence of Mn^{++} remains the same.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben im Temperaturbereich von 60° bis 90° die Inaktivierung des Lysozyms durch die Wärme bei pH 7.9 untersucht.

Für verdünnte Lösungen ist die Kinetik die einer Reaktion ersten Grades. Das Ion Mn^{++} vermindert die Geschwindigkeit der Inaktivierung in einem um so grösseren Verhältnis je stärker die Konzentration des Metalls erhöht ist, dagegen bleibt die Aktivierungsenergie der Reaktion die Gleiche.

In allen Fällen hat man es mit der Inaktivierung des vom Mn^{++} dissoziierten Lysozyms zu tun. Der Komplex "Lysozym-Mn" bleibt unter unseren Versuchsbedingungen stabil. Die Veränderungen welche man in den Geschwindigkeiten der Inaktivierung des Lysozyms in Gegenwart von Mn^{++} beobachtet, sind dem Hinzutreten eines Faktors zuzuschreiben der selbst nicht an der Denaturierung teilnimmt und welcher der Dissociationskoeffizient des Komplexes "Lysozym-Mn" ist, der von der Konzentration des Metalls abhängt.

Für konzentrierte Lysozymlösungen ist die Inaktivierungsreaktion komplizierter, aber der Einfluss des Mn^{++} ist der gleiche.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 237.
- ² E. HULTIN, *Arkiv Kemi*, 2 (1950) 135 et 173.
- ³ L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 318.
- ⁴ M. BIER ET F. F. NORD, *Arch. Biochem.*, 33 (1951) 320.
- ⁵ L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 702.
- ⁶ L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 180.
- ⁷ W. M. CLARK, *The determination of Hydrogen Ions*, Baltimore 1928.
- ⁸ L. MICHAELIS, *Biochem. Z.*, 234 (1931) 139.
- ⁹ G. ALBERTON ET H. L. FEVOLD, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 1.
- ¹⁰ H. FRAENKEL-CONRAT, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 109.
- ¹¹ C. H. W. HIRS, W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1893.
- ¹² H. H. TALLAN ET W. H. STEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 2976.
- ¹³ L. R. WETTER ET H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 237.
- ¹⁴ H. H. TALLAN, *Federation Proc.*, 11 (1952) 297.

Reçu le 2 juin 1952