

LE COMPLEXE OVOMUCOÏDE-TRYPSINE.  
SON ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE ET LE RÔLE DE QUELQUES  
MÉTAUX DANS LA STABILITÉ DE SES CONSTITUANTS

par

LUIGI GORINI ET LUCIENNE AUDRAIN

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

L'ovomucoïde est une mucoprotéine contenue dans le blanc d'œuf. C'est elle qui est responsable du pouvoir inhibiteur de ce dernier sur la trypsine<sup>1</sup>. Cette inhibition n'est pas du type compétitif avec le substrat, et en bloquant par acétylation les groupements aminés de la trypsine, on a pu démontrer que ces groupements ne sont pas essentiels à l'activité trypsique, tandis qu'ils doivent rester intacts pour que la trypsine puisse se lier avec l'ovomucoïde et être inhibée<sup>2</sup>. L'inhibition aurait donc lieu sans blocage des groupements de la trypsine responsables de son activité protéolytique; ces derniers groupements subsisteraient libres dans le complexe ovomucoïde-trypsine, mais avec une activité modifiée. Le complexe ovomucoïde-trypsine a une composition bien déterminée: une molécule d'ovomucoïde (p.m. 28,000) s'unit à une ou deux molécules de trypsine, suivant que, pour cette dernière, on accepte le poids moléculaire de 36,000<sup>3</sup> ou celui proposé tout dernièrement<sup>4</sup> qui est sensiblement la moitié du précédent.

Jugé d'après ses constantes de solubilité et de viscosité, l'ovomucoïde serait remarquablement stable, et cela a permis de le séparer des autres protéines du blanc d'œuf: celles-ci coagulent à 100°<sup>5</sup> ou précipitent par l'acide trichloracétique à 5 %<sup>6</sup>, tandis que l'ovomucoïde reste dans les deux cas en solution. Mais sa stabilité apparaît comme beaucoup moins grande si l'on prend comme test son pouvoir antitrypsique. Ainsi, le pouvoir inhibiteur du blanc d'œuf sur la protéolyse est presque complètement aboli après chauffage à 70° pendant une heure<sup>7</sup> et l'ovomucoïde purifié perd toute activité antitrypsique après chauffage à 100° pendant 1 heure<sup>1</sup>. Il convient de remarquer que l'ovomucoïde est une protéine conjuguée avec un polysaccharide qui constitue les 25-27 % de son poids<sup>8</sup> et on ne sait pas actuellement quels sont les rôles respectifs joués par les deux constituants, protéine et polysaccharide, dans le mécanisme d'inhibition trypsique. L'inactivation de l'ovomucoïde peut donc correspondre aussi bien à une dénaturation de la partie protéique, qu'à un phénomène différent concernant la partie polysaccharidique.

Nous avons estimé que les observations publiées dans une note précédente<sup>9</sup> pouvaient fournir une indication sur l'existence d'une activité protéolytique propre du complexe ovomucoïde-trypsine, et sur la présence de deux formes d'ovomucoïde, l'une active (douée d'activité antitrypsique) et l'autre inactive (sans activité antitrypsique) existant en équilibre à 37°. Le présent travail précise et complète ces observations en étudiant les interactions ovomucoïde trypsine: nous essayons de définir les conditions

dans lesquelles l'action de l'ovomucoïde s'exerce sur la trypsine avec inhibition de l'activité protéolytique de celle-ci, et celles dans lesquelles une action de la trypsine se manifeste sur l'ovomucoïde avec protéolyse de ce dernier.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

##### *Matériel*

L'ovomucoïde utilisé est la fraction II B lyophylisée préparée à partir du blanc d'oeuf selon la méthode décrite par FREDERICQ ET DEUTSCH<sup>6</sup>. La trypsine est de la trypsine cristallisée\*. La sérumalbumine est la fraction V selon COHN ET EDSALI<sup>10</sup> du plasma de boeuf\*\*. Toutes les solutions et les dilutions au cours des essais sont faites avec la solution tampon borate à pH 7.9 d'après CLARK ET LUBS<sup>11</sup> et éventuellement ramenées à pH 7.9 par addition de soude. Les solutions d'ovomucoïde et de trypsine sont faites à 0° et employées immédiatement. La sérumalbumine à 2.4 % est dénaturée par chauffage<sup>12</sup>. Les concentrations et les molarités indiquées sont celles des solutions finales. L'eau utilisée est de l'eau tridistillée dans un appareil en verre Pyrex.

##### *Techniques*

###### *Détermination du pouvoir antitrypsique de l'ovomucoïde*

La détermination se fait en mélangeant au moment de l'analyse les échantillons dont on veut mesurer l'activité antitrypsique, avec une quantité donnée de trypsine. L'action inhibitrice sur la trypsine est immédiate et on mesure par la méthode de Anson<sup>13</sup> l'activité protéolytique résiduelle du mélange, en ajoutant à 0.5 ml de celui-ci 2.5 ml de la solution du substrat suivant la technique déjà décrite<sup>12</sup>. La protéolyse a lieu dans les conditions générales suivantes: Substrat, sérumalbumine dénaturée 2 %; pH 7.9, tampon borate; présence de  $\text{CaCl}_2 \cdot 10^{-2} M$ ; température 25°; temps de protéolyse 10 minutes. On arrête l'action protéolytique par addition de 5 ml. d'acide trichloracétique 5 %. La centrifugation doit avoir lieu après un délai constant, pour tous les essais, et on détermine le coefficient d'extinction à 280 m $\mu$  du surnageant obtenu. Dans ces conditions, l'augmentation du coefficient d'extinction ( $\Delta e$ ) obtenu dans les 10 premières minutes de protéolyse, est proportionnelle à l'activité de la trypsine présente jusqu'à la limite de  $\Delta e = 0.300^{12}$ . Dans cette limite, le  $\Delta e$  mesuré après l'addition d'ovomucoïde est donc l'expression inverse de l'effet inhibiteur sur la trypsine de l'échantillon analysé. D'autre part, le pouvoir antitrypsique de l'ovomucoïde ne se montre proportionnel à la quantité d'ovomucoïde employée, que si l'activité résiduelle du mélange ovomucoïde-trypsine n'est pas inférieure à 10 % de l'activité de la trypsine seule (Fig. 2). Ainsi, les valeurs  $\Delta e$ , entre les limites de 0.030 et 0.300, sont l'expression quantitative inverse de la quantité d'ovomucoïde actif présent dans l'échantillon à analyser.

Au cours des expériences dans lesquelles on suit en fonction du temps la disparition de l'ovomucoïde actif, les prises prélevées en vue de la détermination du pouvoir antitrypsique contiennent soit de l'ovomucoïde seul, soit déjà un mélange d'ovomucoïde et de trypsine. Dans ce dernier cas, cette trypsine, au fur et à mesure de la disparition du

\* Worthington, Friehold, N.J. Elle contient 50 % de  $\text{SO}_4\text{Mg}$ . Les concentrations en trypsine indiquées dans le travail correspondent à la trypsine pure.

\*\* Armour Chicago, Ill.

pouvoir antitrypsique, intervient de plus en plus dans les valeurs des coefficients d'extinction qu'on mesure. Pour chaque expérience donc, on établit la quantité de trypsine à rajouter aux prises au moment de l'analyse, et la dilution qu'il convient de leur faire subir, en se basant sur les considérations suivantes; (a) la quantité de trypsine à rajouter doit porter le rapport global ovomucoïde/trypsine à une valeur telle que dans la prise initiale présentant le pouvoir antitrypsique maximum, le  $\Delta e$  soit au moins égal à 0.030, ce qui correspond à une quantité d'ovomucoïde égale à 80 % de celle de la trypsine. (b) la dilution doit être suffisante pour que, même dans la dernière prise présentant le pouvoir antitrypsique minimum, l'activité résiduelle ne dépasse pas  $\Delta e = 0.300$ .

#### *Détermination de l'activité protéolytique du complexe ovomucoïde-trypsine*

(a) *Sur la sérumalbumine dénaturée.* La technique de mesure restant la même que celle décrite plus haut, le problème se ramène à mesurer l'activité résiduelle d'un mélange ovomucoïde trypsine dans lequel la quantité d'ovomucoïde est égale ou supérieure à celle qui est nécessaire pour former le complexe moléculaire (80 % par rapport à la trypsine). Dans les limites de temps permettant de considérer comme constante la quantité d'enzyme, ici le complexe ovomucoïde-trypsine, la réaction reste d'ordre zéro jusqu'à des valeurs  $\Delta e$  de l'ordre de 0.300. (b) *Sur l'ovomucoïde.* Le problème se pose pour un mélange ovomucoïde-trypsine présentant un grand excès d'ovomucoïde. L'ovomucoïde et ses produits d'hydrolyse étant également solubles dans l'acide trichloracétique à la concentration employée, il n'a pas été possible de suivre la protéolyse de l'ovomucoïde par l'apparition de ses produits d'hydrolyse. On a donc utilisé les techniques précédentes en déterminant la disparition de l'ovomucoïde par la perte de son pouvoir antitrypsique. En réalité, il est possible de suivre directement la protéolyse en dialysant la solution d'ovomucoïde après l'action de la trypsine. On se débarrasse ainsi des peptides courts résultant de l'hydrolyse et le coefficient d'extinction de la solution dialysée devient de plus en plus petit au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse. Cette méthode nous a donné en effet la démonstration directe de l'attaque de l'ovomucoïde par la trypsine, mais elle est trop imprécise pour permettre une étude quantitative.

#### RÉSULTATS

##### *Influence du Ca et du Co sur la stabilité de l'ovomucoïde*

Dans des essais préliminaires, nous avons remarqué que Ca et Co favorisent l'inactivation de l'ovomucoïde d'une façon très marquée; les autres métaux essayés (Mg, Sr, Ba, Mn, Ni, Zn, Cu) n'altèrent pas ou alors très peu, la vitesse d'inactivation obtenue dans le tampon seul. Les solutions d'ovomucoïde à 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  additionnées ou non des chlorures de Ca ou Co ( $10^{-2} M$ ), sont maintenues à 70° et les prises prélevées à des temps donnés sont refroidies rapidement à 0°. La mesure de l'activité antitrypsique résiduelle se fait en mélangeant les prises au moment de l'analyse avec un volume égal d'une solution de trypsine à 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ce qui constitue toujours un excès par rapport à l'ovomucoïde. Au début de l'expérience, cet excès de trypsine donne une activité initiale de l'ordre de  $\Delta e = 0.120$ . La Fig. 1 montre en fonction du temps l'allure du phénomène d'inactivation. La vitesse d'inactivation obtenue dans le cas du tampon seul se trouve fortement augmentée en présence de l'un des deux métaux employés mais quoique le degré d'inactivation atteint soit finalement à peu près le même, l'allure des courbes est

très différente selon le métal présent. Alors qu'en présence de Co on obtient une courbe classique de dénaturation (réaction du premier ordre), on observe en présence de Ca une accélération progressive de l'inactivation. Ce comportement inhabituel ne nous intéresse ici que pour établir une comparaison avec ce qui se passe en présence de trypsine.

Par des expériences analogues, prolongées pendant 48 heures, nous avons pu vérifier qu'une température de 40° est encore trop faible pour provoquer une inactivation sensible, sauf en présence de Co. Nous avons aussi constaté que la concentration de l'ovomucoïde a une grande influence sur la vitesse d'inactivation. Des solutions d'ovomucoïde 10 fois plus concentrées que celles utilisées pour l'expérience de la Fig. 1, s'inactivent plus lentement et, tandis que l'action inactivatrice du Ca par rapport au tampon seul ne varie pas, celle du Co diminue.

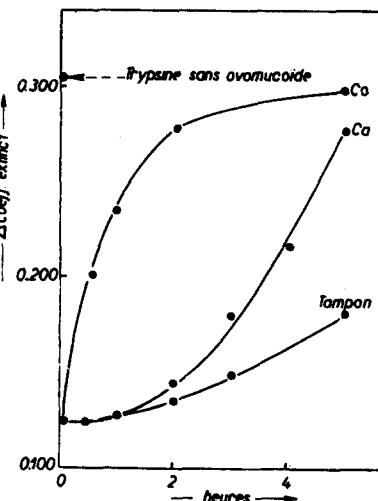


Fig. 1. Inactivation de l'ovomucoïde à 70°C.

### Le complexe ovomucoïde-trypsine

(a) *Activité protéolytique propre du complexe.* La courbe de la Fig. 2 exprime la relation entre la quantité d'ovomucoïde et son effet inhibiteur sur la trypsine; elle comprend deux parties: la première est constituée par une droite, de pente telle que son prolongement coupe l'axe des abscisses en un point correspondant à une quantité stœchiométrique d'ovomucoïde par rapport à la trypsine. Au fur et à mesure de son addition, l'ovomucoïde se combine donc avec une quantité croissante de trypsine pour former un complexe défini pratiquement indissocié. Mais avant d'atteindre l'axe des abscisses, la courbe s'infléchit brusquement et donne lieu à la deuxième partie, de pente très faible. L'activité résiduelle au point d'infexion, très peu sensible à une augmentation ultérieure de la quantité d'ovomucoïde, est toujours à peu près 10 % de l'activité de la trypsine employée au départ. Ce comportement laisse penser que cette activité résiduelle n'est pas due à de la trypsine libre par suite d'une dissociation du complexe inactif, mais plutôt au complexe lui-même.

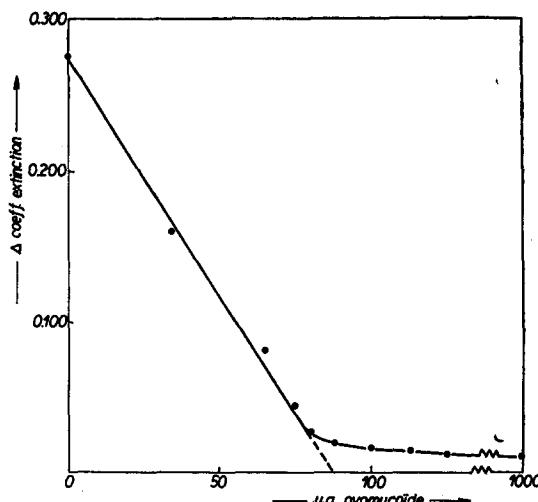


Fig. 2. Inactivation de 100 µg de trypsine par des quantités différentes d'ovomucoïde.

Bibliographie p. 579.

ici déterminée sur de la sérumalbumine à trois concentrations différentes. Les résultats sont exprimés suivant la représentation graphique de LINEWEAVER ET BURK<sup>14</sup> c'est à dire que  $v/v_i$  est exprimé en fonction de la quantité d'inhibiteur  $i$ ;  $v$  étant l'activité de l'enzyme sans inhibiteur, et  $v_i$  celle correspondant à l'effet de différentes quantités d'inhibiteur  $i$  ajoutées à l'enzyme. Le diagramme comprend deux parties correspondant aux deux phases de l'expérience, chacune exprimée dans une base de calcul différente. Dans la partie gauche, correspondant à la phase dans laquelle la quantité d'ovomucoïde rajoutée reste insuffisante pour complexer toute la trypsine,  $v$  est l'activité de la trypsine employée seule; ici, l'inhibition reste indépendante de la concentration du substrat<sup>2</sup>. Dans la partie droite du diagramme, la concentration d'ovomucoïde est devenue suffisante pour que la trypsine soit entièrement complexée; ici,  $v$  est l'activité d'un mélange

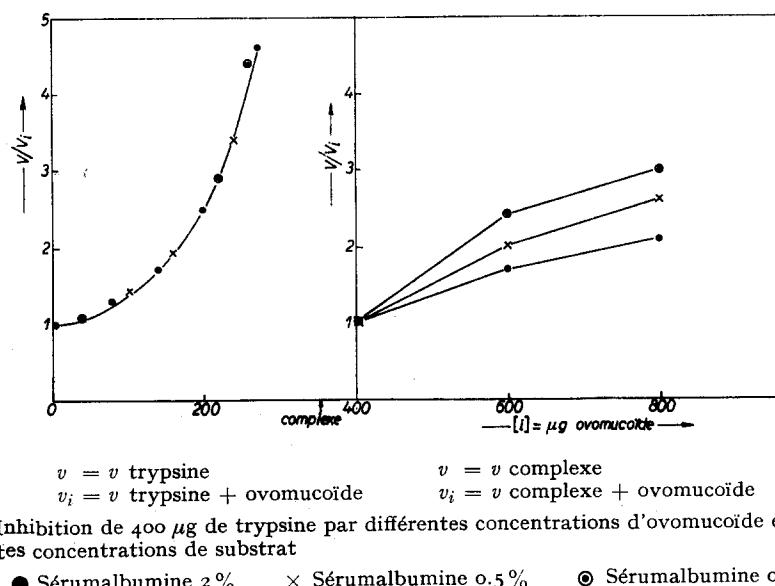


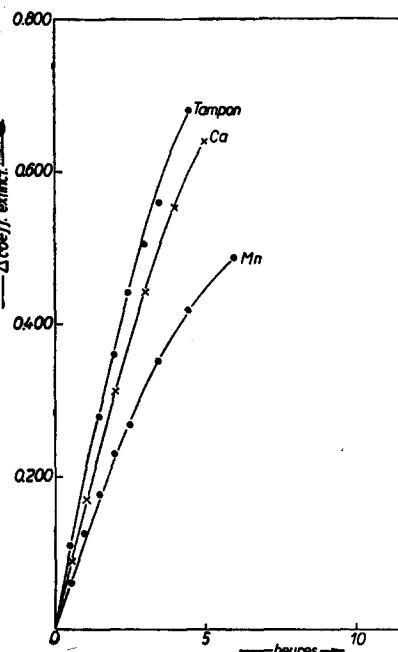
Fig. 3. Inhibition de 400 µg de trypsine par différentes concentrations d'ovomucoïde en présence de différentes concentrations de substrat

● Sérumalbumine 2%      × Sérumalbumine 0.5%      ◉ Sérumalbumine 0.2%

ovomucoïde trypsine dans lequel la trypsine est sûrement toute complexée (la quantité d'ovomucoïde excède de 10 % la quantité stœchiométrique), et  $v_i$  celle de ce même mélange en présence d'un excès croissant d'ovomucoïde; l'inhibition dépend alors des concentrations relatives de l'inhibiteur et du substrat.

Nous pensons pouvoir donner l'interprétation suivante: L'ovomucoïde peut s'unir à la trypsine de deux manières différentes. D'abord il peut se lier avec une affinité relativement grande, aux groupements qui ne sont pas directement responsables de l'activité protéolytique: il se forme le complexe ovomucoïde-trypsine qui se comporte comme un enzyme protéolytique doué d'une activité 10 fois plus faible que celle de la trypsine seule. L'ovomucoïde peut également s'unir aux groupements actifs de la trypsine et de ce fait entrer en compétition avec la sérumalbumine employée comme substrat. Mais l'affinité de cette réaction est très faible; le phénomène de compétition ne deviendra donc évident que lorsque la concentration de l'ovomucoïde sera suffisamment grande vis à vis de celle de la sérumalbumine, ce qui, étant donné la grande affinité de la première réaction, entraîne la transformation préalable de la trypsine en ovomucoïde-trypsine.

(b) *Influence du Ca et du Mn sur l'activité du complexe.* Nous avons étudié l'effet de la présence du Ca et du Mn sur l'activité de mélanges en proportions différentes d'ovomucoïde et de trypsine. Tant qu'il reste de la trypsine libre, ces métaux donnent lieu à une augmentation de la protéolyse, ce qui est en accord avec les observations antérieures relatives à la trypsine<sup>12, 15</sup>, mais c'est seulement à partir du moment où toute la trypsine est liée à l'ovomucoïde, qu'on peut mettre en évidence l'action de ces métaux sur l'activité du complexe. On observe alors un effet inverse du précédent, c'est à dire une diminution de la protéolyse (Fig. 4). Comme ces métaux exercent une action protectrice vis à vis de la protéolyse sur la sérumalbumine employée comme substrat<sup>16</sup>, nous ne pouvons affirmer qu'ils diminuent l'activité protéolytique du complexe. Mais de toute façon ils ne l'augmentent pas comme dans le cas de la trypsine. Ce comportement est une nouvelle preuve en faveur de l'existence, en tant que nouvel enzyme, du complexe ovomucoïdetrypsine.



#### Protéolyse de l'ovomucoïde

(a) *Par le complexe ovomucoïde-trypsine.* Dans certaines conditions, l'ovomucoïde, bien que stable lorsqu'il est seul, ne l'est plus en présence d'une petite quantité de trypsine<sup>9</sup>. D'après ce qui précède, on peut se demander si la disparition de l'ovomucoïde est due à l'activité protéolytique du complexe ovomucoïde-trypsine présent. Nous avons donc étudié la diminution du pouvoir inhibiteur de l'ovomucoïde à une concentration de 3500 µg/ml dans du tampon borate en présence de 1000 µg/ml de trypsine. Déduction faite de la quantité d'ovomucoïde engagée dans le complexe ovomucoïde-trypsine, il reste 2700 µg/ml d'ovomucoïde libre. Cet excès d'ovomucoïde porte, au départ de l'expérience, à une valeur de  $\Delta e = 0.120$  l'activité d'une solution de trypsine de 500 µg/ml qu'on mélange au moment de l'analyse, volume à volume, avec les prises diluées 10 fois. La Fig. 5 montre, en fonction du temps, la diminution de ce pouvoir inhibiteur lorsqu'on maintient le tout à 36° en présence ou en absence de Ca ou de Co ( $10^{-2} M$ ). L'allure des courbes obtenues et leur position relative, sont analogues à celles qu'on avait obtenues lors de

Fig. 4. Activité protéolytique sur la sérumalbumine du complexe ovomucoïde — trypsine [200/200].

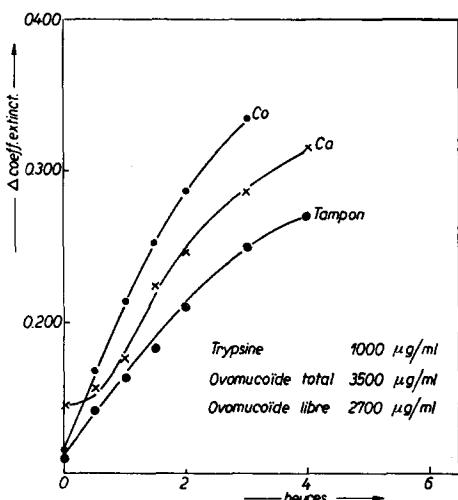


Fig. 5. Activité protéolytique sur l'ovomucoïde du complexe ovomucoïde — trypsine;  $T = 36^\circ C$ .

l'étude de l'inactivation irréversible de l'ovomucoïde en absence de trypsine à une température plus élevée (Fig. 1). En présence de Co, la vitesse est maximum, en présence de Ca on observe une accélération progressive de l'inactivation. Cette analogie est frappante, et bien que dans l'expérience avec trypsine intervienne sûrement la protéolyse de l'ovomucoïde pour qu'il puisse disparaître, on doit penser que le phénomène qui se manifeste doit être analogue à l'inactivation en absence de trypsine, puisqu'il est peu probable que le même comportement des mêmes métaux puisse être attribué à deux phénomènes différents.

Dans une expérience parallèle faite à 24°, l'inactivation n'est décelable qu'à partir de 8 heures, et dans le cas du Co seulement. Le  $Q_{10}$  qu'on déduit de ces deux séries d'expériences à 36° et à 24° est grand, certainement pas inférieur à 10, ce qui est incompatible avec une réaction d'hydrolyse catalysée par la trypsine. Ceci est une nouvelle preuve que l'hydrolyse n'est pas le phénomène qu'on suit directement, mais qu'elle est limitée par une réaction analogue à celle qu'on observe lors de l'inactivation à 70°.

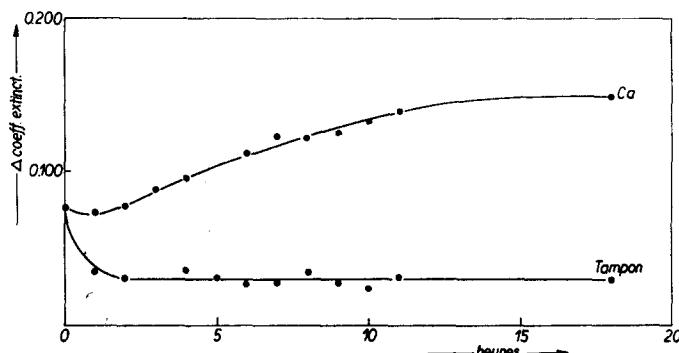


Fig. 6. Inactivation de l'ovomucoïde en présence de trypsine en excès; ovomucoïde 1650 µg/ml; trypsine 2000 µg/ml; T = 36° C.

(b) *Par la trypsine libre.* Lorsque les conditions d'expérience rendent possible l'inactivation de l'ovomucoïde en présence de trypsine, cette inactivation ne s'arrête pas lorsqu'on atteint la quantité nécessaire au complexe, mais elle continue jusqu'à la disparition de toute l'activité antitrypsique. Nous avons donc étudié (Fig. 6) l'inactivation de l'ovomucoïde dans des mélanges dans lesquels il se trouve en défaut par rapport à la trypsine. Une solution, contenant par ml. 1500 µg d'ovomucoïde et 2000 µg de trypsine est maintenue à 36° pendant des temps déterminés en présence ou en absence de Ca  $10^{-2} M$ . Les mesures d'activité sont faites après une dilution au 10ème de chaque prise. En présence de Ca, le léger excès de trypsine qui subsistait au début s'inactive très vite; toutefois, la courbe, sitôt après cette inactivation, devient parallèle à l'axe des abscisses: l'activité de la trypsine ne s'annule donc pas ici, comme ce serait le cas après seulement deux ou trois heures si la trypsine était conservée seule sans ovomucoïde. En présence de Ca, l'activité croît progressivement jusqu'à atteindre la même valeur que présenterait une égale quantité de trypsine seule sans ovomucoïde si elle avait été conservée en présence de Ca pendant le même temps et à la même température. En outre, une addition de Ca au cours de l'expérience réalisée en absence de ce métal, porte l'activité à une valeur d'autant plus voisine du maximum atteint par l'essai entièrement réalisé en présence de Ca, que l'addition de métal a été faite plus tôt. La présence de Ca favorise

donc l'inactivation de l'ovomucoïde, permettant ainsi son hydrolyse par la trypsine avec laquelle il ne peut plus se complexer, étant devenu inactif. Le Co aussi favorise l'inactivation de l'ovomucoïde, mais, à l'opposé du Ca, il ne protège pas la trypsine devenue libre contre son inactivation à la température de l'expérience.

#### CONCLUSION

L'addition d'une solution d'ovomucoïde à une solution de trypsine donne lieu à la formation immédiate du complexe ovomucoïde-trypsine. Ce complexe se comporte comme un enzyme protéolytique dont l'activité est 10 fois plus faible que celle de la trypsine libre. Etant donné que l'ovomucoïde se fixe sur les groupements de la trypsine qui sont susceptibles d'être acétylés, il est intéressant de noter que le blocage de ces groupements par le résidu acétyle à la place de l'ovomucoïde, donne lieu aussi à un nouvel enzyme, acétyl-trypsine, dont l'activité est 80 % de celle de la trypsine libre<sup>2</sup>.

La trypsine engagée dans le complexe est beaucoup plus stable que la trypsine libre vis à vis de l'inactivation irréversible par la chaleur, et il suffit de détruire le pouvoir antitrypsique de l'ovomucoïde par des moyens appropriés, pour voir réapparaître la trypsine active. Ceci est encore possible après un temps 20 fois plus grand que celui qui serait suffisant pour atteindre une inactivation totale de la trypsine seule maintenue dans les mêmes conditions. Alors que le Ca ou le Mn, métaux protecteurs de la trypsine libre, sont sans effet sur la stabilité à 37° de la trypsine engagée dans le complexe, leur présence devient nécessaire dès que l'ovomucoïde a disparu. D'autre part, le Ca ou le Mn, qui favorisent l'activité de la trypsine libre, n'augmentent pas celle du complexe ovomucoïde-trypsine. On explique leur effet sur la trypsine libre en admettant que ces deux métaux protègent la forme active de la trypsine vis à vis de son inactivation réversible<sup>12, 15</sup>. Puisque l'activité du complexe n'est plus susceptible d'être augmentée, il est logique de penser que l'existence d'une forme de trypsine réversiblement inactive, est rendue impossible lorsque la trypsine se trouve liée à l'ovomucoïde. Donc ce dernier agirait sur l'équilibre d'inactivation réversible de la trypsine, de la même manière que le Ca ou le Mn. Devant ces effets semblables de l'ovomucoïde et du Ca ou du Mn, sur la stabilité de la trypsine, on ne doit pas conclure que le lieu de leur action sur la molécule protéique est le même. En effet, en étudiant l'inactivation de la trypsine par l'ovomucoïde en présence ou en absence de Ca ou de Mn, nous n'avons pas observé de compétition entre l'ovomucoïde et l'un de ces métaux lors de la formation du complexe. La protection d'une certaine structure d'une protéine peut donc se faire également en agissant sur des lieux différents de sa molécule.

Après avoir ainsi défini les actions de l'ovomucoïde sur la trypsine, nous passons à l'étude des actions de la trypsine sur l'ovomucoïde. Nous retenons l'hypothèse déjà énoncée<sup>9</sup> qui se trouve en accord avec les résultats de nos recherches actuelles. L'ovomucoïde en solution serait constituée par deux formes A et B en équilibre, la première (A) active au point de vue antitrypsique, la seconde (B) représentant un état réversiblement inactif, forme de passage obligatoire soit vers l'inactivation irréversible, soit vers l'hydrolyse. Cet équilibre sera déplacé vers B soit que la vitesse d'inactivation irréversible devienne sensible par effet d'une élévation de température, soit qu'intervienne l'hydrolyse de la forme B sous l'effet d'une activité protéolytique. Selon les quantités relatives d'ovomucoïde et de trypsine en présence, cette activité protéolytique est due soit à de la trypsine libre en excès, soit à de petites quantités de trypsine qui se libèrent par effet de

la dissociation du complexe, soit enfin au complexe lui-même. De toute façon, qu'il s'agisse d'une élévation de température ou d'une action protéolytique, si la vitesse de disparition de B est rendue suffisamment grande pour éviter une accumulation de cette forme, la même réaction réversible d'inactivation de A vers B sera toujours le facteur limitant soit de l'inactivation irréversible, soit de l'hydrolyse. Le Co et le Ca ont le même effet dans les deux cas, leur point d'intervention étant la réaction limitante  $A \rightarrow B$ , quelle que soit la voie suivant laquelle B disparaît.

Une action de la trypsine sur l'ovomucoïde est donc possible et elle dépend des conditions permettant l'existence d'une forme d'ovomucoïde inactive réversible, exactement comme l'autolyse de la trypsine dépend des conditions favorisant la présence dans ses solutions de sa forme inactive réversible<sup>3</sup>. Nous avons eu recours à une hypothèse analogue lors de l'étude de l'action de la trypsine sur la sérumalbumine<sup>16</sup> ou sur le lysozyme<sup>17</sup>. Dans tous ces cas, la protéolyse se fait à la suite du déplacement d'un équilibre entre une forme inattaquable (A) et une attaquable (B) du substrat. Il s'agirait de la même relation fonctionnelle entre dénaturation et protéolyse d'une protéine, déjà établie pour la  $\beta$ -lactoglobuline<sup>18</sup>. Toute substance capable d'intervenir dans l'équilibre entre la forme active et la forme inactive de l'enzyme, et dans celui entre la forme résistante et la forme sensible du substrat, peut dans ces conditions jouer un rôle essentiel dans la protéolyse. Dans le cas du système ovomucoïde-trypsine, la vitesse de protéolyse presque inexiste en absence de Ca, devient très grande en sa présence, parce que ce métal augmente en même temps l'action de l'enzyme en favorisant la forme active de la trypsine, et la sensibilité du substrat en favorisant la forme inactive de l'ovomucoïde.

En conclusion de ces recherches, il est finalement utile de souligner que le système enzyme-inhibiteur constitué par le mélange trypsine-ovomucoïde, dans lequel l'enzyme est une protéase et l'inhibiteur une protéine, n'est pas un système inert: plus ou moins rapidement, suivant les conditions de conservation et surtout en présence de Ca, l'ovomucoïde disparaîtra et la trypsine sera libérée. Tant qu'il est présent, l'ovomucoïde réduit fortement l'activité protéolytique du système et s'oppose à l'effet d'inactivation irréversible exercé par la chaleur sur la trypsine libre.

## RÉSUMÉ

Le complexe ovomucoïde-trypsine se comporte comme un enzyme dont l'activité protéolytique sur la sérumalbumine est environ 10 fois plus faible que celle de la trypsine.

Tout excès d'ovomucoïde devient substrat du complexe et, pour cette raison, inhibiteur compétitif vis à vis de la sérumalbumine que nous utilisons pour suivre la protéolyse.

La présence de Ca ou de Co accélère l'inactivation irréversible à 70° de l'ovomucoïde et favorise sa protéolyse à 36° par le complexe. La réaction qui régit soit l'inactivation irréversible, soit la protéolyse, est le passage réversible entre la forme active et une forme inactive de l'ovomucoïde.

Le complexe ovomucoïde-trypsine n'est pas un système inert. Plus ou moins rapidement suivant les conditions de conservation, l'ovomucoïde disparaît et la trypsine est libérée. Tant qu'il est présent, l'ovomucoïde s'oppose à l'inactivation thermique de la trypsine.

## SUMMARY

The ovomucoid-trypsin complex behaves like an enzyme whose proteolytic activity on serum albumin is about 10 times less than the activity of trypsin alone.

Ovomucoid in excess of the stoichiometric quantity becomes a substrate of the complex and a competitive inhibitor of the "standard" substrate serum albumin used by us.

Calcium or cobalt increases both the irreversible inactivation at 70° C of ovomucoid, and its proteolytic breakdown at 36° C by the complex. The reaction which controls either the irreversible

inactivation or the proteolysis is the reversible conversion between the active and inactive forms of ovomucoid.

The ovomucoid-trypsin complex is not a static system. More or less rapidly depending on conditions, the ovomucoid is inactivated and the trypsin is liberated. As long as it is present, the ovomucoid prevents the thermal inactivation of trypsin.

### ZUSAMMENFASSUNG

Der Ovomucoid-Trypsin-Komplex verhält sich wie ein Enzym dessen proteolytische Aktivität gegenüber Serumalbumin ungefähr zehnmal schwächer als die des Trypsins ist.

Jeglicher Überschuss an Ovomucoid dient dem Komplex als Substrat und hemmt daher in konkurrierender Weise die Proteolyse des Serumalbumins, dessen wir uns bedienen, um die Aktivität des Enzyms auszuwerten.

Die Gegenwart von Ca und Co Ionen beschleunigt die irreversible Inaktivierung des Ovomucoids bei 70° C und fördert die Proteolyse durch den Komplex bei 36° C. Die Reaktion von der das Ausmass der irreversiblen Inaktivierung einerseits, und der Proteolyse andererseits abhängt, kann als ein reversibler Übergang des Ovomucoids aus einer aktiven in eine inaktive Form angesehen werden.

Der Ovomucoid-Trypsin-Komplex bildet kein ruhendes System. Mehr oder weniger rasch, je nach den Aufbewahrungsbedingungen, verschwindet das Ovomucoid unter Freisetzung des Trypsins. Solange es gegenwärtig ist, hemmt das Ovomucoid die thermische Inaktivierung des Trypsins.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. LINEWEAVER ET C. W. MURRAY, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 565.
- <sup>2</sup> H. FRAENKEL-CONRAT, R. S. BEAN ET H. LINEWEAVER, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 385.
- <sup>3</sup> J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOT, *Crystalline Enzymes*, 2nd Ed., Columbia University Press, New-York 1948.
- <sup>4</sup> H. GOLDENBERG ET A. D. McLAREN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1131.
- <sup>5</sup> L. G. LONGSWORTH, R. K. CANNAN ET D. A. MCINNES, *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (1940) 2580.
- <sup>6</sup> E. FREDERICQ ET H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 499.
- <sup>7</sup> C. DELEZENNE ET E. POZERSKI, *Compt. rend. soc. biol.*, 55 (1903) 935.
- <sup>8</sup> J. C. LEWIS, N. S. SNELL, D. J. HIRSHMAN ET H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 23.
- <sup>9</sup> L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 702.
- <sup>10</sup> J. T. EDSALL, *Advances in Protein Chem.*, 3 (1947) 384.
- <sup>11</sup> W. M. CLARK, *The Determination of Hydrogen Ions*, Baltimore 1928.
- <sup>12</sup> L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 318.
- <sup>13</sup> M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 79.
- <sup>14</sup> H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- <sup>15</sup> M. BIER ET F. F. NORD, *Arch. Biochim. Biophys.*, 33 (1951) 320.
- <sup>16</sup> L. GORINI ET L. AUDRAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 180.
- <sup>17</sup> L. GORINI ET F. FELIX, En cours de rédaction.
- <sup>18</sup> K. LINDEMSTRÖM-LANG, *Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol.*, 14 (1949) 117.

Reçu le 15 septembre 1952